



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**“Caracterización de la emergencia y repetibilidad de la
onda folicular en alpacas (*Vicugna pacos*)”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Alvaro VASQUEZ YDROGO

ASESOR

Mg. Wilfredo HUANCA LÓPEZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vasquez A. Caracterización de la emergencia y repetibilidad de la onda folicular en alpacas (*Vicugna pacos*) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0261-EPMV/FMV-2018.

PRESIDENTE:

.....
Alexei Vicent Santiani Acosta

MIEMBROS:

.....
Wilfredo Huanca López
Asesor de la Tesis

.....
Milder Ayón Sarmiento

.....
Rocío Silvia Sandoval Monzón

San Borja, 21 de diciembre de 2018

V° B°

.....
Dra. Daphne Ramos Delgado
Directora
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **miércoles 19 de diciembre de 2018**, a las **11:00 horas**, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0261-EPMV/FMV-2018**, integrado por los siguientes profesores:

MV. Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta	Presidente de Jurado
MV. Mg. Wilfredo Huanca López	Asesor de la Tesis
MV. Milder Ayón Sarmiento	Miembro del Jurado
MV. Mg. Rocío Silvia Sandoval Monzón	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **VASQUEZ YDROGO, ALVARO** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“CARACTERIZACIÓN DE LA EMERGENCIA Y REPETIBILIDAD DE LA ONDA FOLICULAR EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **12:20 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

.....
Alexei Vicent Santiani Acosta: MV. Dr. Prof. Asociado T.P.

.....
Wilfredo Huanca López MV. Mg.: Prof. Principal D.E.

.....
Milder Ayón Sarmiento: MV. Prof. Asociado D.E.

.....
Rocío Silvia Sandoval Monzón: MV. Mg. Prof. Auxiliar T.C

DEDICATORIA

A **Teofila Ydrogo, mi madre**, maravillosa mujer que me inculco sus valores y quien con muchísimo amor, esfuerzo y sacrificio me apoyo noblemente en esta carrera. ¡¡¡Logramos la meta!!!

A **Jose Vasquez, mi padre**, extraordinario hombre quien con su fiel estilo me inspiro a realizarme y sobresalir. ¡¡¡Gracias por tu esfuerzo y paciencia!!!

A mis hermanos **Juan, Víctor, Luz, Edith y Orlando** quienes como unos padres estuvieron siempre presentes apoyándome, brindándome su confianza y la oportunidad de compartir momentos felices a su lado. ¡¡¡Gracias por hacer suyos mis éxitos!!!

A **Freshia**, mi bonita, por impulsarme constantemente a mejorar, por su amor y comprensión. ¡¡¡Gracias Principessa por enseñarme a descubrir el poder de una sonrisa!!!

A **Cajamarca**, bella región cuya tierra que vio nacer a mis padres y abuelos, y de la cual yo me siento muy orgullo de pertenecer

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Wilfredo Huanca, gran maestro, por todos estos años de amistad y enseñanzas, muchas de ellas impartidas en el maravilloso altiplano puneño, que lograron despertar en mí el interés por la investigación científica. Así mismo; mi agradecimiento al Dr. Alfredo Pozo, por su increíble apoyo brindado durante todo el transcurso de este estudio, por sus enseñanzas impartidas, carisma y amistad.

Al Dr. Juan Zevallos y a todo el equipo del Centro de Investigación y Producción (CIP) Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano (UNAP) en Puno; por brindarme las facilidades para la realización del presente trabajo y por permitirme formar parte de un noble grupo humano.

A mi grandiosa Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por toda su formación y conocimientos que me fueron impartidos; y en especial a mis compañeros y amigos: Melissa, Cecibel, Milagros, Gabriel, Giovanni, Paulo, Nancy, Melanie, Gabriela, Liz. Ya que, sin su continuo apoyo, paciencia y esfuerzo, el presente trabajo no se hubiese realizado.

Al todos los miembros del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM: Nathaly, Abiel, Farhid, Jesús, Camilo, Juan Carlos, Renato y Josías. ¡¡¡Gracias muchachos por su apoyo y amistad!!!

Al proyecto CON/CON-2016: “Caracterización de la emergencia y repetibilidad de la onda folicular y su efecto sobre la respuesta a la estimulación ovárica en alpacas (*Vicugna pacos*)”, Resolución 00838-R-16 / código 160801081, por el financiamiento al presente estudio.

ÍNDICE

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Anatomía reproductiva femenina de la alpaca	3
2.2 Fisiología reproductiva en la alpaca	5
2.2.1 Pubertad.....	5
2.2.2 Comportamiento reproductivo.....	6
2.2.3 Mecanismo neuroendocrino de la función ovárica.....	7
2.2.4 Foliculogénesis.....	10
2.2.5 Dinámica folicular.....	12
2.2.5.1 Emergencia folicular.....	13
2.2.6 Reserva ovárica.....	14
2.2.6.1 Número de folículos antrales.....	15
2.2.6.2 Hormona antimülleriana.....	18
2.2.7 Intervalo interonda.....	19
2.2.8 Ovulación.....	20
2.2.9 Cuerpo lúteo.....	22
2.3 Repetibilidad	24
2.4 Técnicas de asistencia reproductiva	26
2.4.1 Ultrasonografía del aparato reproductivo.....	26
2.4.2 Sincronización hormonal de la dinámica folicular.....	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración	29
3.2 Animales	29
3.3 Determinación del número de folículos antrales	30

3.4 Procedimiento metodológico.....	30
3.5 Análisis estadístico.....	32
IV. RESULTADOS.....	33
V. DISCUSIÓN.....	40
VI. CONCLUSIONES.....	46
VII. LITERATURA CITADA.....	47
VIII. APÉNDICE.....	57

RESUMEN

El objetivo del trabajo actual fue caracterizar y determinar el número de folículos emergentes en cada onda folicular en alpacas. El estudio fue realizado durante el primer trimestre del 2016 en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano en la región Puno. Se emplearon 34 alpacas suri hembras adultas, vacías, sin cría al pie, sin antecedentes de anomalías reproductivas y con presencia de un folículo dominante ≥ 7 mm, para ser inducidas a ovulación mediante la aplicación intramuscular de 4.2 μ g de acetato de buserelina (día 0). Dos días después del estímulo hormonal, se registró el desarrollo folicular individual a partir del número total de folículos antrales ≥ 3 mm en ambos ovarios mediante un seguimiento ecográfico transrectal interdiario de hasta 60 días. El total de animales en investigación tuvieron acceso a pastizales naturales y estuvieron sujetos a similares condiciones de manejo. Se determinó que la emergencia folicular se produjo el día 4.5 ± 1.4 (rango 2-8). El número de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm calculado durante la emergencia folicular fue en promedio 2.8 ± 1.3 (rango 1-8). Los resultados muestran que a pesar de haber una notable similitud ($P > 0.05$) en el NFA ≥ 3 mm durante emergencias sucesivas, existe una diferencia significativa en el número de folículos emergentes entre animales distintos ($P < 0.05$). La repetibilidad del NFA ≥ 3 mm calculada durante la emergencia folicular fue de 0.72. El intervalo interonda promedió los 16.9 ± 3.9 días, se definió como un carácter variable entre animales y presentó una repetibilidad de 0.23. Se concluye que el número de folículos emergentes ≥ 3 mm en alpacas representa una característica variable entre individuos distintos, pero altamente repetible dentro de un mismo animal; siendo además el intervalo interonda un carácter no repetible en alpacas.

Palabras claves: emergencia, folículos, repetibilidad, alpacas

ABSTRACT

The objective of this work was to characterize the follicular emergence and determine the repeatability of the follicular wave in alpacas. The study was conducted during the months of January and March 2016 at the Center of Research and Production Chuquibambilla of the National University of the Altiplano in Puno. We used 34 adult suri alpacas, empty, without breeding at the foot, with no history of reproductive abnormalities and with the presence of a dominant follicle ≥ 7 mm, to be induced to ovulate by intramuscular application of 4.2 μg of busserelin acetate (day 0). Two days after the hormonal stimulation, the individual follicular development was recorded from the total count of antral follicles ≥ 3 mm in both ovaries by transrectal ultrasound follow-up of up to 60 days. All the animals in the study were aliment natural pastures and get the like management conditions. It was determined that the emergence of the follicular wave occurred on day 4.5 ± 1.4 (range 2-8). The number of antral follicles (NFA) ≥ 3 mm calculated during the follicular emergency was on average 2.8 ± 1.3 (range 1-8). The results show that despite having a remarkable similarity ($P > 0.05$) in NFA ≥ 3 mm during successive emergencies, there is a significant difference in the number of follicles emerging between different animals ($P < 0.05$). The repeatability of NFA ≥ 3 mm calculated during follicular emergence was 0.72. The interwave interval averaged 16.9 ± 3.9 days, was defined as a variable character among animals and presented a repeatability of 0.23. It is concluded that the number of emergent follicles ≥ 3 mm in alpacas represents a variable characteristic among different individuals, but highly repeatable within the same animal; the inter-wave interval being also a non-repeatable character in alpacas.

Key words: emergency, follicles, repeatability, alpaca

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Valoración de la repetibilidad según intervalos	24
Cuadro 2. Día de la emergencia folicular post sincronización.....	34
Cuadro 3. Día de aparición del folículo preovulatorio ≥ 7 mm post sincronización y diámetro máximo del folículo dominante	34
Cuadro 4. Características del cuerpo lúteo durante una fase luteal natural inducida.....	35
Cuadro 5. Número de folículos ≥ 3 mm durante la emergencia folicular y un periodo aleatorio (días 12 y 24) de crecimiento folicular	37
Cuadro 6. Repetibilidad del número de folículos antrales ≥ 3 mm.....	37
Cuadro 7. Clasificación de alpacas según su número promedio de folículos antrales ≥ 3 mm.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del número total de folículos ováricos ≥ 3 mm en vacas Holstein evaluadas por ultrasonografía transrectal (n=385). Adaptado de Mossa <i>et al.</i> (2012).....	16
Figura 2. Diseño observacional.....	31
Figura 3. Distribución del número de folículos antrales ≥ 3 mm determinados durante la emergencia folicular	36
Figura 4. Número promedio de folículos antrales ≥ 3 mm entre emergencias foliculares.....	36
Figura 5. Clasificación de alpacas según su número de folículos antrales ≥ 3 mm	38
Figura 6. Distribución del intervalo interonda en días.....	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha de registro ecográfico individual	57
Anexo 2. Número de folículos emergentes ≥ 3 mm por alpaca	58
Anexo 3. Prueba de normalidad al número de folículos emergentes ≥ 3 mm.....	58
Anexo 4. Número de folículos emergentes ≥ 3 mm por alpaca - valores transformados.....	58
Anexo 5. Prueba de normalidad al número de folículos emergentes ≥ 3 mm–valores transformados	58
Anexo 6. Distribución del número de folículos antrales 3mm entre emergencias foliculares sucesivas	58
Anexo 7. Distribución del número de folículos antrales ≥ 3 mm entre alpacas.....	58
Anexo 8. Evaluación del número de folículos ≥ 3 mm durante la emergencia folicular y en estadios aleatorios de crecimiento folicular	58
Anexo 9. Repetibilidad del número de folículos ≥ 3 mm durante periodos aleatorios de crecimiento folicular	58
Anexo 10. Repetibilidad del número de folículos emergentes ≥ 3 mm	58
Anexo 11. Distribución del número de folículos según la clasificación de los animales	58
Anexo 12. Repetibilidad del intervalo interonda	58

I. INTRODUCCIÓN

Las poblaciones altoandinas asentadas por arriba de los 3,800 m.s.n.m tiene por ocupación más importante a la ganadería y es la crianza de los camélidos sudamericanos domésticos una actividad de impacto en su desarrollo socio-económico, esto gracias a la gran adaptabilidad de estas especies a las agrestes condiciones del medio ambiente y al beneficio directo que se obtiene a partir de la producción de fibra de magnífica calidad y de proteína animal (Fernández-Baca, 1991); este recurso se suele distribuir generalmente en rebaños de 10 a 100 animales (Bravo y Huanca W, 2012).

La mejora de la calidad genética de un rebaño sustenta la aplicación de biotecnologías reproductivas como la superovulación y la transferencia de embriones, con el propósito de producir múltiples crías de hembras genéticamente superiores (Stewart, 2013). Sin embargo, a pesar de que el uso de protocolos de superovulación y que la tecnología de transferencia de embriones ha sido reportada en camélidos sudamericanos, aún existen deficientes resultados en la aplicación de la técnica de transferencia de embriones en estas especies, lo que ha sido relacionado con una alta variabilidad en la respuesta a los tratamientos con gonadotropinas durante la superestimulación y una disminución en la tasa de recuperación de embriones (Ratto *et al.*, 2013). Se cree que en parte esta variación es dependiente del número de folículos que emergen durante el inicio de cada onda folicular, como sucede en rumiantes (Ireland *et al.*, 2007), en donde la técnica de superovulación ha demostrado ser en vacas más efectiva al ser aplicada en aquellos animales con un mayor número de folículos antrales al inicio de la superovulación (Singh *et al.*, 2004). Los pequeños folículos antrales son el objetivo directo de los diversos protocolos con gonadotropinas y es precisamente la gran variabilidad individual en su número lo que constituye el factor más limitante en el éxito de las biotecnologías de producción de embriones por superovulación en rumiantes (Ireland *et al.*, 2007).

Múltiples estudios sobre el desarrollo de folículos ováricos en bovinos y dromedarios han demostrado la posibilidad de poder realizar una clasificación de los animales a partir del número de sus folículos emergentes, previo al inicio de los procedimientos de superovulación; esto gracias a que se ha descrito por ultrasonografía, que el número de folículos antrales durante la emergencia de las ondas foliculares representa una característica muy variable entre individuos distintos, pero altamente repetible dentro de un mismo animal (Burns *et al.*, 2005; Manjunatha *et al.*, 2012).

A partir de lo expuesto, el presente estudio pretende caracterizar y determinar el número de folículos emergentes en cada onda folicular en alpacas, que permita realizar una clasificación de los animales basada en el número de sus folículos emergentes.

II. REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

2.1 Anatomía reproductiva femenina de la alpaca

Se ha descrito que los ovarios son dos estructuras similares ubicados dentro de la cavidad abdominal; ellos logran quedar suspendidos en la región sublumbar a través del mesovario y se disponen dorso lateralmente a los cuernos uterinos (Sato *et al.*, 1986; Bravo *et al.*, 2000). Su forma es oval y ligeramente aplanada, que se caracterizan por presentar, en las hembras adultas, una superficie irregular y lobular (Sato *et al.*, 1986), a consecuencia de a la aparición de uno o más folículos o de un cuerpo lúteo en diferentes estadios de maduración. El ovario cuenta con una corteza y una médula. En la zona de la corteza se encuentran los folículos (Bacha Jr y Bacha, 2001).

En alpacas adultas, aquellos folículos diametralmente superiores a los 4 mm son prominentes en la superficie del ovario (Adams *et al.*, 1989) llegando a sobresalir hasta el 85% de la superficie del mismo (Del Campo *et al.*, 1996) y ser detectables vía rectal por palpación; sin embargo, por ultrasonografía los folículos son identificados cuando estos alcanzan los 3 mm de diámetro (Adams *et al.*, 1989). El ovario mide en promedio: 1.6 x 1.1 x 1.1 cm en su largo, ancho y profundidad respectivamente; con un peso individual promedio de 2 g (Sato y Montoya, 1990). El ovario está rodeado completamente por la *bursa ovarica*, que constituye un pliegue del mesosálpinx, cuya porción apical comunica con la fimbria del oviducto por medio de un amplio orificio circular (Bravo *et al.*, 2000).

Los oviductos son dos estructuras tubulares de trayecto sinuoso suspendidos en la cavidad abdominal por el mesosalpinx, miden 10-12 cm de longitud y su diámetro es de apenas 2-3 mm (Sato

et al., 1986); individualmente, los oviductos están unidos a su respectivo cuerno uterino ipsilateral por medio de una angosta abertura llamada ísmo, de 3 a 4 mm de diámetro, que se haya rodeada por un esfínter (Tibary y Memon, 1999). La presencia de este esfínter permite controlar los movimientos retrógrados de fluidos del útero hacia los oviductos, pero sí permite su paso en el sentido inverso (Sumar y Adams, 2007). Los oviductos cumplen funciones de importancia, pues en ellos se realiza la captación de ovocitos liberados desde el ovario y el almacenamiento de espermatozoides depositados en útero después de una copula exitosa, que proporcione un ambiente óptimo que posibilite la fecundación y que garantice el desarrollo del embrión (Sato y Montoya, 1990).

En relación al útero, se presenta bicornio e *in situ* se asemeja a la letra “Y”, esta estructura presenta: cuerpo, cérvix y cuernos. Con una forma cilíndrica, los cuernos giran en dirección ventral describiendo un trayecto espiral y una posición final lateral en relación a su cuerno respectivo, miden cada uno 7.5 cm de largo (Sato *et al.*, 1986) y 3.01 cm de diámetro aproximadamente (Bravo y Sumar, 1989). El cuerno siniestro es más grande que el diestro a partir del periodo fetal; siendo esto más evidente en individuos con múltiples pariciones (Fernández-Baca *et al.*, 1973). El cuerpo del útero es relativamente corto, de forma tubular, con un largo y diámetro de 1.5 y 2 cm, respectivamente (Sato *et al.*, 1986). La mucosa del cuerpo es lisa, constituida por células epiteliales cilíndricas simples y en donde la porción submucosa contiene un componente fibroso denso abundante en la cual se localizan diminutas glándulas dispersas (Sato *et al.*, 1986). La cérvix es un canal sinuoso de 2 a 5 cm de largo, cuenta con 2 a 3 anillos anulares y esta tapizada por una mucosa de superficie finamente plegada (Sato *et al.*, 1986). En el mismo sentido, el nivel de apertura o de cierre se encuentra sujeto al factor endocrino, de manera que su luz se dilata durante la receptividad sexual facilitando así la cópula; pasando a ser estrecha en animales gestantes con el fin de procurar evitar una posible contaminación del útero durante el desarrollo del feto (Sato y Montoya, 1990).

La vagina en su eje longitudinal en promedio mide 13.4 cm y cuenta con un diámetro medio de 3.4 cm, la cual presenta una mucosa con múltiples dobleces (Bravo y Sumar, 1989). Se caracteriza por ser una estructura muy elástica. El himen constituye el espacio formado en medio de la vagina y la vulva. Se ha descrito que la vulva representa el límite genital desde caudal, la cual presenta una hendidura vulvar de aproximadamente 2.5 cm de longitud que comunica con la parte externa. (Sato y Montoya, 1990; Bravo *et al.*, 2000); Los labios vulvares son poco prominentes, generalmente pigmentados y con escasa pilosidad. El clítoris está ubicado en

comisura labial ventral y mide en su eje longitudinal de 0.5 a 1 cm aproximadamente (Sato *et al.*, 1986).

Con respecto a la vascular del aparato reproductor, estudios realizados respecto a la distribución de las arterias demostraron en alpacas que un 90% de animales presentaron un cuerno uterino siniestro más irrigado (Sato *et al.*, 1988) pese a que ambos ovarios son igualmente activos en el aporte de folículos (Fernandez Baca *et al.*, 1970a). Esta mayor irrigación del cuerno uterino izquierdo es debido a una rama de la arteria uterina derecha, que logra cruzar a través del tabique intercornual (Del Campo *et al.*, 1996).

2.2 Fisiología reproductiva en la alpaca

2.2.1 Pubertad

Por definición se considera que las hembras de los mamíferos alcanzan la pubertad cuando estas son capaces de liberar ovocitos viables y son competentes en desarrollar un comportamiento sexual completo (Hafez y Hafez, 2002). En tal sentido; Novoa *et al.* (1972) comprobó en alpacas que las hembras de 12 meses de edad muestran un comportamiento sexual semejante a hembras de dos o más años. Sin embargo, se ha descrito por ultrasonografía que en alpacas destetadas a los 8 meses de edad ya exhibían un desarrollo de folículos diametralmente de los 2 a los 4 mm, con 9 meses presentaban folículos ≥ 5 mm y a los 11 meses ya contaban con folículos ≥ 7 mm (Pacheco *et al.*, 2017). En llamas; a través de la concentración del sulfato de estrona, se determinó que la actividad folicular comienza alrededor de los 5-6 meses de edad (Adams, 2007).

El inicio de la pubertad es influenciado por factores ambientales y está muy condicionado con el aspecto nutricional, siendo un mecanismo para evaluar este último el peso corporal. Por esta razón, se acepta que, para iniciar la pubertad, el animal deba lograr dos tercios del peso corpóreo de un ejemplar en etapa adulta, lo que en alpacas correspondería a un peso vivo ≥ 33 Kg (Sumar, 1985), se demostró una relación positiva existe al calcular el peso vivo en las madres y la tasa de nacimientos subsiguiente en alpacas (Leyva y Sumar, 1981).

Se percató en alpacas, que al brindarles unas buenas condiciones de nutricionales luego del destete (8 meses de edad), cerca del total de alpacas de 1 año pueden alcanzar un peso corpóreo de 33 kg (Bustinza y Medina, 1986). Sin embargo; debido a las agrestes condiciones del medio ambiente y el tipo de pasturas de los andes en el Perú, es usual que las alpacas no logren ese peso el primer año y es por ello que el inicio de la gestación se suele postergar hasta alcanzado los 2 años de edad (Fernández-Baca, 1993). Así mismo; se describió mediante ecografía que en alpacas pos-destetadas mantenidas en pastos cultivados, es más frecuente la presencia de folículos ($\geq 2\text{mm}$) en aquellos animales con un mayor peso vivo promedio en comparación con alpacas mantenidas en pasturas naturales (Pacheco *et al.*, 2017).

2.2.2 Comportamiento reproductivo

Según Bravo y Sumar (1989) los camélidos sudamericanos cuentan con la capacidad de poder reproducirse con éxito durante todo el año; esto debido a que existe un crecimiento folicular continuo, sin que el efecto de la estación influya en el conteo de folículos $\geq 6\text{ mm}$ visualizados en la corteza ovárica. Sin embargo; se ha descrito que dentro de su ambiente natural, rebaños de alpacas desarrollan una conducta por estaciones, en donde se observan que los nacimientos se realizan en los meses de verano (primer trimestre del año) (San-Martin *et al.*, 1968). Periodo que corresponde con las más favorables condiciones del medio ambiente y mayor disponibilidad de pastos. Actualmente se consideran que ciertos factores determinantes como temperatura, nutrición y fotoperiodo, pueden lograr influenciar en las áreas del sistema nervioso central responsable de regular la conducta reproductiva de estas especies (Brown, 2000).

En las comunidades campesinas de los andes, predomina un sistema de crianza donde se mantienen juntos hembras y machos de forma continua durante todo el año; y bajo estas condiciones el empadre y las pariciones ocurren durante los meses lluviosos y cálidos (diciembre a marzo), pues son en estos meses cuando es más probable que la alimentación sea abundante, de mejor calidad y existan mejores condiciones ambientales. En cambio, se ha visto que hembras vacías que permanecieron apartadas de machos y que fueron presentadas a ejemplares machos de forma periódica exhiben una actividad sexual normal y son capaces de procrear en cualquier temporada (Fernández-Baca *et al.*, 1972).

Según lo describen Adams *et al.* (1989), el comportamiento sexual de los camélidos sudamericanos refleja una actividad compleja; y en el cual, según Novoa *et al.* (1972) en este comportamiento existe una variabilidad que podría estar atribuida a su grado de domesticación, jerarquía social y distribución geográfica. San-Martin *et al.* (1968) clasifican a los camélidos sudamericanos dentro del grupo de los ovuladores inducidos, es decir representan a aquellos animales que necesitan de un estímulo exógeno (por ejemplo, la cópula) para que se desencadene *in vivo* el mecanismo ovulatorio (Fernandez-Baca *et al.*, 1970b). Se ha observado que en alpaca, sus periodos de receptividad sexual son extensos y alcanzan hasta los 40 días de duración, siendo interrumpidos por breves periodos de no más de dos días (San-Martin *et al.*, 1968).

2.2.3 Mecanismo neuroendocrino de la función ovárica

La reproducción está regulada a través de un complejo vínculo entre el sistema nervioso y el sistema endocrino. Estos dos sistemas interactúan en grupo para iniciar, coordinar y regular todas las funciones reproductivas a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Para realizar dicha labor el sistema endocrino utiliza sustancias denominadas hormonas, moléculas que se originan de las glándulas endocrinas o del sistema nervioso; las cuales inhiben, estimulan o regulan la actividad sobre el tejido u órgano reproductivo blanco (Hafez y Hafez, 2002; Senger, 2005). El sistema nervioso tiene el rol fundamental de transmitir los estímulos sensitivos externos y traducirlos en señales neuronales que estimulen al hipotálamo, este cual se encuentra constituido por un conjunto de somas neuronales los cuales producen la hormona liberadora de gonadotropina o GnRH y la liberan hacia el sistema de vasos sanguíneos porta-hipofisiario que comunica con la adenohipófisis o glándula pituitaria anterior, las células gonadotrópicas hay presentes al ser estimuladas por la GnRH sintetizan y liberan de forma pulsátil hacia la circulación sistémica las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). La conexión con la neurohipófisis es directa (Senger, 2005).

La GnRH es un neuropéptido clave para el control reproductivo en todas las especies de vertebrados, es liberado desde la eminencia media del hipotálamo por las células parvicelulares. Existen dos mecanismos que regulan la liberación de GnRH en los mamíferos hembras que conducen a la secreción de la hormona luteinizante (LH) para inducir la ovulación (Bakker y Baum, 2000); en animales de ovulación espontánea (vacas, yeguas, ovejas, cabras, cerdos, primates y roedores) la ovulación se produce a intervalos regulares. La dinámica folicular conduce a la aparición de uno o

más folículos dominantes, según la especie, lo cual conduce a un aumento en la concentración sistémica de estradiol. La elevación de estradiol estimula un cambio en la respuesta de negativa a positiva, lo cual permite activar la liberación de GnRH en la circulación portal. Recientes estudios han demostrado que las neuronas hipotalámicas que expresan Kisspeptin son fundamentales para integrar el efecto del cambio negativo a positivo por el estradiol y activar la liberación de GnRH (Pinilla *et al.*, 2012). La GnRH provoca a su vez un marcado aumento transitorio de los niveles de LH desde los gonadótropos de la adenohipófisis. Este incremento en los niveles de LH conduce a una activación de una respuesta inflamatoria y proteolítica que induce la ruptura del folículo ovulatorio y a la extrusión de ovocito del *cúmulus oophorus* (Hafez y Hafez, 2002).

En ovuladores inducidos (conejos, camellos, gatos, hurones y camélidos sudamericanos) el efecto de la retroalimentación positiva del estradiol esta reducida o ausente. En los ovuladores inducidos se ha sugerido que las señales genito-somasensoriales producidas por la intromisión del pene durante la cópula estimulan neuronas noradrenérgicas de la eminencia media del hipotálamo para promover la liberación de la GnRH (Bakker y Baum, 2000). Se ha asumido además que otros estímulos externos que incluyen señales olfativas, auditivas, emotivas, táctiles y visuales son capaces de estimular la ovulación (Fernández-Baca *et al.*, 1970a). En un trabajo realizado por Adams *et al.* (2005), ellos lograron aislar en alpacas y llamas un potente agente capaz de inducir la ovulación dentro de la fracción plasmática del semen de los machos. Al cual se le identifico como un factor de crecimiento neuronal β (β -NGF) y se planteó que su absorción desde el plasma seminal estaría probablemente facilitada por la hiperemia del endometrio excoriado que se produce por la intromisión del pene durante la cópula (Ratto *et al.*, 2012). Según el modelo propuesto por El Allali *et al.* (2017) en camellos, el β -NGF puede inducir una oleada transitoria de LH preovulatoria por su efecto directo sobre los gonadótropos de la adenohipófisis o a través de las neuronas kisspeptin quienes actúan como procesadores centrales que transmiten las señales del β -NGF para la activación de las neuronas de GnRH.

Según comenta Senger (2005); independientemente de la especie, es posible delimitar el desarrollo folicular en las siguientes tres etapas: Reclutamiento, selección y dominancia. El reclutamiento inicia cuando un grupo de folículos dependientes de hormonas (principalmente FSH) inicia su crecimiento (Hafez y Hafez, 2002), para ello el descenso de la concentración de hormonas inhibitoras de la FSH (estradiol, inhibina y folistatina) que posibilitan la liberación pulsátil de FSH que lograra inducir la emergencia folicular (Driancourt, 2001).

Para que se inicie el reclutamiento es necesario que la FSH se una a sus receptores en las células de la granulosa para inducir la producción de la aromatasa P450; la cual es responsable de convertir la testosterona, la cual procede de la teca, en estrógenos (Palma, 2008); para que se empiecen a manifestarse los receptores de FSH dentro de las células de la granulosa es necesaria la acción autocrina/paracrina de la activina producida por las propias células de la granulosa (Nilsson y Skinner, 2004). Otra importante consecuencia de la FSH en las células de la granulosa es estimular la síntesis de conexina Cx43, molécula proteica que conforma puentes celulares tanto entre la granulosa, la teca y el ovocito; un evento fundamental en el desarrollo del ovocito y del folículo, pues facilita la entrada de distintos iones, impulsos eléctricos y moléculas pequeñas (Ca^{2+} , AMPc, etc) entre estas células. El ovocito podrá retornar su potencial meiótico, el cual estuvo reprimido por el AMPc por las células producidas por las células de la granulosa (Senger, 2005; Palma, 2008). El reclutamiento folicular es influenciado de forma positiva por la insulina y el factor de crecimiento insulínico, pues sensibilizan tanto a los receptores de la granulosa como a la teca a la acción de las hormonas FSH y LH, respectivamente (Adams *et al.*, 2008; Monniaux *et al.*, 2014).

En la selección folicular, la cantidad de folículos en crecimiento disminuye debido a la atresia de los folículos subordinados. Durante el transcurso de la atresia folicular se produce una reabsorción del líquido almacenado en el antro folicular y la subsecuente apoptosis del componente celular que conforma el folículo (ovocito, granulosa y teca), evento que suele coincidir con una disminución en la concentración sérica de FSH luego del reclutamiento (Adams *et al.*, 2008); esta disminución suele ser atribuida al efecto negativo que tienen el estradiol y la inhibina en referencia a la secreción hipofisaria de la hormona FSH, los cuales limitan el crecimiento de los folículos subordinados y reduce su sensibilidad a las gonadotropinas circulantes. La FSH tiene la capacidad de poder estimular en las células de la granulosa la síntesis de activina solo en determinados folículos (artilugio que favorece la retroalimentación positiva a través de la FSH) y complementariamente estimula la producción de folistatina en dichos folículos conforme aumentan su diámetro folicular; la cual puede unirse con la activina, dentro del licor folicular, logrando disminuir con ello la proporción de activina libre funcionalmente activa (Driancourt, 2001).

En la dominancia folicular, el crecimiento del folículo es rápido, esto se acompaña de una maduración en el ovocito y un incremento en la síntesis de estradiol; la cual se ha descrito que en rumiantes es capaz de producir una retroalimentación positiva eficaz que logra estimular la liberación de GnRH por parte del hipotálamo e inducir un aumento en los receptores para GnRH en la adenohipófisis, induciendo con ello un pico de LH que es capaz de producir la ruptura del folículo y

posterior liberación del ovocito (Senger, 2005). Si se produce una remoción del folículo dominante, sucederá un marcado incremento transitorio de la hormona FSH en el transcurso de las próximas 12 horas y con ello aparecerá una nueva emergencia folicular en 24 horas (Adams *et al.*, 2008).

En especies monotecas; se ha observado que el folículo dominante es el primero del grupo reclutado en expresar receptores de LH. Los receptores para LH se expresan tanto en las células de granulosa como en las de la teca, mientras que los receptores para FSH se ubican solamente en las células de la granulosa. Cuando la secreción de FSH alcanza sus concentraciones más bajas, el folículo dominante aumentará su proporción de receptores sensibles a LH y por lo tanto el crecimiento del folículo dependerá por completo de los niveles de LH, es mediante este mecanismo que aquellos folículos subordinados no serán capaces de sintetizar un alto número de receptores para LH resultando en la atresia de ellos (Driancourt, 2001; Adams *et al.*, 2008). La LH se une a sus receptores a nivel de las células de la teca lo cual estimula la conversión del colesterol en andrógenos (Senger, 2005).

Existen otros factores que inhiben el desarrollo de los folículos los cuales incluyen: a la proteína 90 de shock térmico, la enzima superóxido dismutasa (SOD) y al factor de crecimiento transformante α (TGF α), los mismos que son capaces de reducir la función de la enzima aromataza; viéndose con ello disminuida la producción de estradiol por las células de la granulosa. Sin embargo, algunos otros factores como las proteínas morfogénicas del hueso, miembros de la superfamilia del TGF β , son capaces de inducir la síntesis de estradiol y multiplicación de las células de la granulosa (Palma, 2008). Si está presente un cuerpo lúteo funcional; las concentraciones circulantes de progesterona bloquearán los centros hipotalámicos, logrando disminuir la secreción de LH y con ello se conduce a la atresia del folículo dominante (Driancourt, 2001).

2.2.4 Foliculogénesis

Los folículos ováricos son estructuras que se ubican dentro de los ovarios de todos los mamíferos, siendo esenciales para la función reproductiva de la hembra. Cada folículo nutre el desarrollo del ovocito y cada ovocito individual es rodeado, generalmente, por un solo folículo. El folículo y el ovocito se desarrollan en conjunto durante un largo periodo de tiempo que culmina con un número específico de folículos liberando sus ovocitos (ovulación) en el tracto reproductivo para su

fertilización. Siendo los eventos del desarrollo de los folículos similares para una amplia gama de especies (Evans, 2003).

El folículo es la unidad fundamental del ovario que desarrolla dos actividades esenciales: la síntesis de hormonas esteroideas y de ovocitos viables. Estas competencias son realizadas por los denominados folículos antrales, quienes cuentan con una capa celular interna constituida por las células de la granulosa delimitada por una membrana basal, la cual es responsable de aislar a dichas las células del estroma mesenquimatoso circundante (Filipiak *et al.*, 2016).

Fortune *et al.* (2004) explican que la foliculogénesis es un proceso largo que toma aproximadamente 6 meses en mamíferos mayores como el bovino; y solamente, 8 semanas en roedores. La maduración folicular se puede dividir en dos periodos, el primer periodo de la foliculogénesis corresponde al transcurrido entre las etapas denominadas: folículo primordial y folículo preantral, periodo en el cual se señala existe una multiplicación de las células que conforman la granulosa y la aparición de múltiples receptores hormonales para FSH y LH, lo cual les confiere a las células de la granulosa y las células de teca una capacidad de respuesta a dichas gonadotropinas. El segundo periodo es caracterizado por una mayor multiplicación y diferenciación celular; adquiriendo además la capacidad de síntesis de estrógenos (en especialmente estradiol), que da lugar a folículos con una dependencia completa de un suministro gonadotrópico constante.

Las distintas necesidades de los folículos a las gonadotropinas antes y después de la formación del antro folicular quedo reflejado en un estudio *in vivo* en ovejas, en las que se observó que luego de 70 días de haber sido hipofisectomizadas, el número total de folículos preantrales diametralmente inferiores a 0.2 mm disminuyeron, indicando así que aquellos folículos en alguna manera están sometidos a una regulación gonadotrópica en largo plazo. Sin embargo, se vio que aquellos folículos diametralmente superiores a 2 mm dependieron por completo de gonadotropinas pues requirieron de tan solo 4 días para atresarse (Dufour *et al.*, 1979).

Los folículos se originan durante el desarrollo fetal a partir de las células germinales primordiales que surgen del saco vitelino que migran hacia la cresta gonadal para originar a los ovocitos inmaduros, en estado de quiescencia, los cuales serán rodeadas por múltiples células pregranulosas, denominándose a esta estructura folículo primordial. Se ha descrito que luego del nacimiento, las células epiteliales pregranulosas que externamente rodean al ovocito empiezan a diferenciarse cambiando su aspecto aplanado hacia una apariencia cúbica y se denominan células de

la granulosa, en este periodo los folículos se designan como folículos primarios (Palma, 2008); una lámina basal circunda la granulosa, esta barrera logra separar al folículo del resto del tejido mesenquimatoso del ovario, dejándolo sin una entrada directa a la red vascular y por lo tanto a la acción endocrina de las gonadotropinas (Hirshfield, 1985). Conforme prosigue su desarrollo, las células de la granulosa empezaran a proliferar y conformaran varias capas (de 2 a 6) que rodean al ovocito. El componente celular de la granulosa adquirirá una capacidad de secreción del denominado líquido (licor) folicular, al cual conforme aumente ira formando espacios entre ellas; con el tiempo, todos estos espacios que fueron creados irán confluyendo para formar una cavidad conocida como antro folicular, la cual almacena un fluido rico en hormonas de naturaleza esteroidea (predominantemente estrógenos); así mismo estas células producen mucopolisacáridos que conforman una corona protectora (zona pelúcida) en torno al ovocito, en este estadio el folículo se denomina folículo secundario (Palma, 2008). Por otra parte, las células de la granulosa continúan proliferando, esta multiplicación va acompañada de una reorganización y diferenciación del estroma que rodea al folículo, formándose así las tecas foliculares interna y externa. La teca se conecta ala red vascular (angiogénesis); debido a ello se permite la entrada de gonadotropinas hacia el folículo en desarrollo (Yan *et al.*, 2001). Con el tiempo el antro ira aumentando de tamaño hasta que adquiera las características propias de un folículo en preovulación o también llamado folículo de Graaf (Palma, 2008). En bovinos, la configuración del antro sucede cuando los folículos miden entre 0.2 y 0.4 mm de diámetro (Fortune, 2003).

2.2.5 Dinámica folicular

Según plantea Evans (2003), una onda folicular inicialmente se caracteriza por presentar un desarrollo coordinado de un grupo o cohorte de folículos (emergentes) previamente reclutados, que en un comienzo aumentan su dimensión durante un periodo de desarrollo simultaneo y de forma subsecuente se diferencian en un único folículo dominante (número especie-específico) que continuará desarrollándose, lo cual traerá consigo además una regresión a intervalos variables de los restantes folículos. El folículo durante la dominancia describe tres estadios o fases de desarrollo: fase de crecimiento (aumenta diametralmente), fase de estática (con cambios diametrales pequeños) y la fase de regresión (disminuye diametralmente) (Stevenson, 2007).

Basado en las observaciones ultrasonográficas de llamas (Adams *et al.*, 1989), alpacas (Vaughan *et al.*, 2004) y vicuñas (Miragaya *et al.*, 2004) se pudo describir que ante la ausencia de un estímulo ovulatorio los ejemplares exhiben oleadas de crecimiento folicular continuas, de forma semejante a lo reportado en otras especies domésticas (bovino, ovino, equino y porcino). Pero en desigualdad con otros mamíferos, ante la falta de estímulo sexual el mecanismo de la ovulación no se desarrolle se origina la ovulación ni la conformación de un cuerpo lúteo, dando como consecuencia que al término el folículo en dominancia inicie su atresia (Sumar, 2002). Así mismo, se reportó que en alpacas existe una asociación negativa entre el número total de folículos antrales detectados y el tamaño que logra el folículo en dominancia presente en uno de los ovarios; lo que indica que el crecimiento folicular en alpacas se produce en ondas, al igual que llamas, y de manera similar a los patrones de desarrollo folicular ovárico en otras especies domésticas (Adams *et al.*, 1990; Miragaya *et al.*, 2004; Vaughan *et al.*, 2004).

2.2.5.1 Emergencia folicular

La emergencia folicular se define como el crecimiento simultáneo de un grupo de folículos controlado de forma endocrina por gonadotropinas (principalmente FSH) (Driancourt, 2001). A través de la ultrasonografía se pudo verificar que la emergencia folicular es observable cuando los folículos alcanzan aproximadamente los 2-4 mm de diámetro en ovinos y 4-6 mm de diámetro en bovinos (Evans, 2003). En ovinos, todos los folículos mayores a 2 mm de diámetro son reclutados; y una vez que ha ocurrido la selección folicular, el proceso de reclutamiento es bloqueado. El tiempo durante el cual se lleva a cabo la emergencia folicular varía según la raza de ovinos; así, las ovejas boorola presentan un tiempo más prolongado de emergencia folicular si se las compara con las ovejas merino (Hafez y Hafez, 2002). Según Gigli *et al.* (2006), en bovinos el tiempo de emergencia folicular es de 2 días, lo que según el número de ondas foliculares correspondería hasta el día 4 o 6, este periodo equivale al 20% del ciclo estral; lo cual significaría que este es el tiempo para iniciar un protocolo de superovulación en un programa de transferencia de embriones.

En camellos dromedarios el inicio de una onda folicular se caracteriza por la emergencia sincrónica de un grupo de folículos antrales (3-4 mm de diámetro); a medida que la onda progresa un folículo es seleccionado y continúa su crecimiento mientras que los otros regresionan a intervalos variables, en donde además se pudo describir por ultrasonografía que el día de la emergencia folicular se basó en la primera detección del futuro folículo en dominancia ≥ 4 mm (Manjunatha *et al.*, 2012).

En alpacas hembras fértiles, no apareadas, durante el inicio de cada onda folicular se recluta una cohorte de folículos antrales proseguida por la emergencia de un grupo de hasta 10 folículos antrales de 2 a 3 mm; que en conjunto pueden alcanzar a crecer de forma simultánea hasta los 4 a 5 mm de diámetro, por un tiempo de hasta 8 días después de la emergencia (Vaughan *et al.*, 2004). De este grupo, se selecciona uno que se convertirá en el folículo dominante y continuará su desarrollo, mientras que el resto sufrirá atresia y regresión (Adams *et al.*, 1989; Vaughan *et al.*, 2004). En base a lo anterior, se propuso en alpacas y llamas que el día de la emergencia folicular se considere como el momento en que el nuevo folículo alcance un diámetro ≥ 4 mm (Adams *et al.*, 1990; Andrade, 2007). Una vez que uno de los folículos se convierta en el dominante, este continuará creciendo (fase de crecimiento), en alpacas la fase de crecimiento tarda 5-9 días, tiempo requerido para que alcance el tamaño preovulatorio (7-12 mm), en donde permanecerá (fase estática) durante 2-8 días hasta que finalmente empiece la disminución de su diámetro (fase regresión); si no se induce la ovulación, esta última fase podría tardar de 3-8 días (Vaughan *et al.*, 2004). Se ha observado que en alpacas hembras con folículos ≥ 7 mm de diámetro durante la fase de crecimiento o con folículos maduros en fase estática (8-12 mm) pueden ovular después del apareamiento, mientras que aquellos animales con folículos pequeños (4-5 mm) o con presencia de un folículo dominante en fase de regresión no pueden ovular (Bravo *et al.*, 1991).

2.2.6 Reserva ovárica

En los mamíferos, las hembras cuentan con una reserva de ovocitos finita que han interrumpido su crecimiento en la etapa de folículos primordiales; y, son ellos quienes constituyen la única fuente de ovocitos para ser ovulados durante toda su vida reproductiva. El tamaño de la reserva de folículos primordiales preestablecidos es resultado de una interacción entre los genes, las hormonas y el microambiente materno-fetal. En la mayoría de las especies la reserva de folículos primordiales termina de formarse antes del nacimiento (mujer, vaca, oveja), en el periodo posnatal temprano (gata y roedores) o se inician luego del nacimiento (conejos) (Monniaux *et al.*, 2014). Siendo el tamaño de la reserva ovárica altamente variable entre individuos de la misma edad (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2008).

Se ha descrito que durante la vida fetal en bovinos existen alrededor de 2'700,000 folículos primordiales, de los cuales 90% degeneran y reduciendo la reserva ovárica al nacimiento en 135,000 folículos primordiales; los cuales se irán reduciendo hasta la pubertad y después de la misma (Palma, 2008). En ovinos, se ha descrito que el ovario de un animal antes de la pubertad puede contener una

reserva de folículos primordiales estimada de 300,000; en donde muchos de ellos han abandonado esta etapa en el transcurso de su vida fetal. En una oveja adulta, puede contener hasta 86,000 folículos primordiales durante cada onda folicular crecen entre 100 a 400 folículos antrales de los cuales solamente de 10 a 40 son visibles ecográficamente en la superficie del ovario (Mariana *et al.*, 1991). Durante la foliculogénesis, los folículos primordiales abandonan la reserva ovárica, cuando algún folículo abandona la reserva folicular, este seguirá creciendo hasta que logre ovular o se degenere y atresie (Hafez y Hafez, 2002). Siendo el número de ovulaciones independiente de la reserva ovárica (Monniaux *et al.*, 2014).

La estimación de la reserva ovárica se puede realizar a través de dos métodos diferentes: Por ultrasonografía ovárica, que aporta estimaciones precisas del número de folículos; y por la medición de marcadores endocrinos, que da una evaluación indirecta de la reserva ovárica disponible (Monniaux *et al.*, 2014).

2.2.6.1 Número de folículos antrales

El número de folículos antrales (NFA) representa al conjunto de folículos ováricos visualizados en un momento determinado; ellos pueden ser cuantificados y clasificados según su tamaño a través de cortes histológicos, por laparoscopia o por ultrasonografía. En la actualidad, el NFA es considerado como un biomarcador con múltiples aspectos positivos relacionados con la eficiencia reproductiva en aquellos individuos con alto NFA (Taneja *et al.*, 2000); su investigación y uso se ha reflejado en las múltiples publicaciones en la literatura que reportan mejoras en los parámetros reproductivos y respuestas más eficientes a las biotecnologías reproductivas en mamíferos como el humano (Fleming *et al.*, 2015), ovino (Mossa *et al.*, 2012), bovino (Ireland *et al.*, 2007; Ireland *et al.*, 2008; Shahzad *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017) y camello dromedario (Manjunatha *et al.*, 2012).

La influencia del número de folículos en el ovario sobre los parámetros reproductivos es una hipótesis planteada ya hace muchos años atrás (Hunter, 1787). Con el pasar de los años varios estudios han descrito la correlación positiva que existe entre el NFA y la fertilidad en la hembra (Ireland *et al.*, 2008). Por ejemplo, animales con alto NFA se han relacionado con un mayor número de embriones producidos *in vitro* (Singh *et al.*, 2004), pues se determinó que vacas con bajo NFA presentaron un menor número de embriones recuperados en comparación con vacas con un alto NFA (Ireland *et al.*, 2007); así mismo, se expuso que un NFA alto se asocia de manera significativa con

altas concentraciones de progesterona en circulación (Evans *et al.*, 2010; Ireland *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2015), y un menor intervalo entre partos (Mossa *et al.*, 2012).

El número de folículos antrales es una característica que posee una alta repetibilidad dentro de un individuo; pero que sin embargo, posee una alta variabilidad entre individuos de la misma especie (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2008) y de especies distintas (Manjunatha *et al.*, 2012); por ejemplo se ha descrito en vacas, que el NFA se pueden observar menor de 5 folículos en algunos animales y más de 50 en otros (Mossa *et al.*, 2012) (Fig. 1); un patrón similar en la frecuencia de distribución que siguen los folículos antrales ha sido descrito en camellos dromedarios, donde un promedio de 12.77 ± 0.93 (rango 8 a 34) folículos antrales ≥ 3 mm emergen por cada onda folicular (Manjunatha *et al.*, 2012), estos datos abren una posibilidad de poder realizar una clasificación en hembras según sus diferencias individuales del NFA (Evans *et al.*, 2010) permitiendo así agrupar a los animales en aquellos con un bajo y un alto NFA (Ireland *et al.*, 2009); en donde además, se ha podido detallar que mayores concentraciones de FSH se correlacionan de forma significativa con altos NFA, ello descrito en vacas (Ireland *et al.*, 2007; Mossa *et al.*, 2010) y ovejas (Mossa *et al.*, 2008).

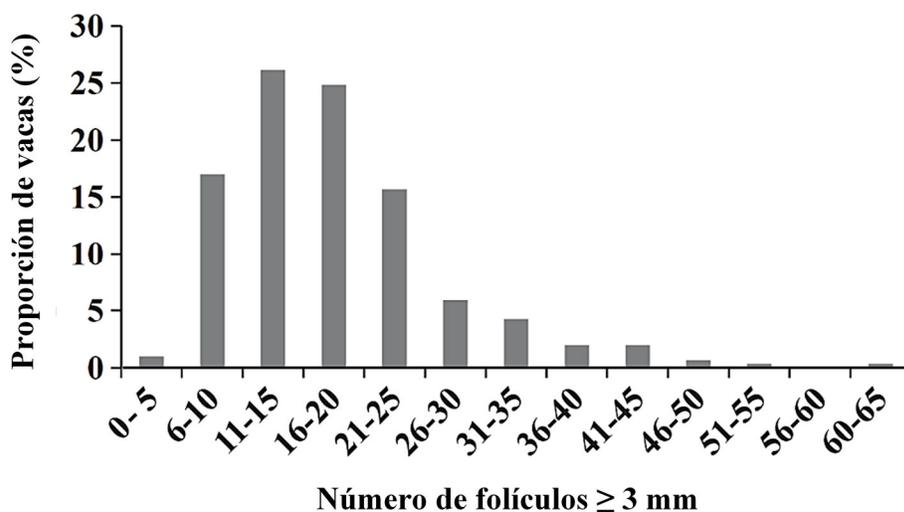


Figura 1. Distribución del número total de folículos ováricos ≥ 3 mm en vacas Holstein evaluadas por ultrasonografía transrectal (n=385). Adaptado de Mossa *et al.* (2012)

La detección de los folículos antrales ya es posible a partir de las 2 semanas de edad en terneras (Evans *et al.*, 1994), pero algunos investigadores especifican que es posible observar un gran aumento del NFA ≥ 3 mm aun hasta los 3 meses de edad (Honaramooz *et al.*, 2004). Con el pasar de los años, el NFA empieza a disminuir con la edad y esto se debe a que el número de ovocitos decrece de forma irreversible luego de su formación en la vida fetal; esta disminución ha sido reportada a partir de los 5 años en vacas (Cushman *et al.*, 2009) y a partir de los 37 años, hasta la menopausia, en mujeres (Gougeon y Chainy, 1987). La capacidad de responder a los protocolos de superovulación, al éxito a la fecundación *in vitro* y de la transferencia de embriones ha sido asociado negativamente con la edad avanzada y ello puede corresponder con una disminución numérica de folículos y ovocitos que conforman la reserva ovárica, en especies de ovulación única como los bovinos (Singh *et al.*, 2004)

La cuantificación histológica de los folículos antrales como una herramienta en investigación permitió determinar una correlación positiva entre el NFA y el número total de folículos en el ovario (reserva ovárica). Por ejemplo, se determinó que vacas con bajo NFA también presentaban hasta un 80% menos de folículos primordiales, transicionales, primarios, secundarios y antrales; en comparación con individuos con alto NFA (Ireland *et al.*, 2008). En alpacas (Céliz, 2017), a través de cortes histológicos de ovarios se reportó que el rango de folículos antrales fue de 6 a 32.

Los pequeños folículos antrales son el objetivo directo de los diversos protocolos con gonadotropinas y es precisamente la gran variabilidad individual en su número lo que constituye el factor más limitante en el éxito de las biotecnologías de producción de embriones por superovulación en rumiantes (Ireland *et al.*, 2007). La técnica de superovulación ha demostrado ser en vacas más efectiva al ser aplicada en aquellos animales con un mayor número de folículos antrales al inicio de la superovulación (Singh *et al.*, 2004), sin embargo la respuesta superovulatoria no ha sido reportado como un rasgo hereditario (Tonhati *et al.*, 1999).

Aunque los protocolos de superovulación han sido reportados en camélidos sudamericanos, existe una respuesta variable a los diversos programas de superovulación (Ratto *et al.*, 2013). Por ejemplo; Huanca T (2008) describió una gran variabilidad en la respuesta a la superovulación en alpacas, donde se observó una escala que comprende de 0 a 27 folículos ≥ 7 mm. Una amplitud menor en torno al número de folículos ≥ 7 mm fue reportada en llamas, en las que se observó un rango de entre 0 a 17 folículos (Correa *et al.*, 1997). Este patrón de respuesta también ha sido descrito en bovinos, y se dilucidado que en parte esta variabilidad puede deberse al número de folículos antrales (NFA) que presentan cada animal al inicio de los protocolos de superovulación; por ejemplo, Ireland

et al. (2007) observaron que vacas con un bajo NFA respondieron mal a la superovulación y produjeron un número reducido de embriones transferibles, en comparación con vacas con un NFA alto. Los resultados obtenidos de estas investigaciones describen la presencia de una gran variabilidad en la respuesta superovulatoria que aunada a tasas de recuperación de embriones muy bajas podrían deberse al NFA durante la emergencia folicular en cada animal.

Los problemas relacionados a la nutrición durante periodos críticos de la gestación se reflejan a través de alteraciones en el crecimiento, fisiología y metabolismo del futuro desarrollo de las crías (McMillen y Robinson, 2005). El impacto de la nutrición sobre el NFA en la progenie de vacas se expuso en el trabajo que Mossa *et al.* (2009) realizaron, en donde un grupo de vacas lecheras gestantes fueron sometidas a una restricción nutricional (restricción, 60% de su requerimiento de energía) durante el primer trimestre de su gestación. En las que luego del parto, se pudo observar que las terneras de aquellas vacas que fueron sometidas a restricción alimenticia presentaron un NFA menor en aproximadamente un 60% en comparación con terneras nacidas de vacas sin restricción alimenticia.

2.2.6.2 Hormona antimülleriana

La hormona antimülleriana (AHM) es una glicoproteína dimérica, miembro de la familia del factor de crecimiento transformante β , que es considerada como el marcador endocrino con una mayor sensibilidad y especificidad para la estimación de la reserva ovárica en mujeres (La Marca *et al.*, 2010) y rumiantes (Monniaux *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017). La expresión de la AMH está estrictamente restringida a las células de la granulosa de folículos preantrales (primarios y secundarios) y antrales pequeños, cesando su secreción en los folículos en fase de dominancia (La Marca *et al.*, 2010).

La cuantificación de la AMH puede ser usada en vacas para seleccionar las hembras acordes con el tamaño de la población folicular, ya que la AMH puede ser considerada como un factor altamente correlacionado con el número de folículos antrales, de ovocitos sanos y el tamaño de la reserva ovárica (Ireland *et al.*, 2011), que brinda la ventaja de poder emplearse independientemente de las etapas foliculares pues los niveles de AMH muestran poca variación intraciclo e interciclo (Gobikrushanth *et al.*, 2017).

Debido a que la AMH es tomada como *gold estándar* para la estimación de la reserva ovárica en la mujer y animales, diversos investigadores evaluaron comparativamente las concentraciones séricas de AMH y otros biomarcadores disponibles. Por ejemplo, Fanchin *et al.* (2003) describieron en mujeres que los niveles de la AMH se correlacionan significativamente mejor con el número de folículos antrales (NFA) determinados por ultrasonografía, que con otros marcadores endocrinos (FSH, LH, Inhibina B y E2), similar a la alta correlación identificada por Ireland *et al.* (2008) en vacas. Así mismo, Broer *et al.* (2009) observó que el valor de sensibilidad y especificidad son comparables para la AMH y el NFA cuando se evaluó su respuesta a la estimulación ovárica.

2.2.7 Intervalo interonda

El intervalo interonda (IIO) se define como el tiempo, en días, que transcurre entre el inicio de dos emergencias foliculares consecutivas; este periodo representa al tiempo necesario para completar una onda folicular (Cebra *et al.*, 2014). En camélidos sudamericanos, el IIO es aún discutido; por ejemplo, se ha observado en alpacas, llamas y vicuñas dicho intervalo fue de 16 (Vaughan *et al.*, 2004), 18 (Chaves *et al.*, 2002) y de 4 (Miragaya *et al.* 2004) días, respectivamente. En ese sentido, Bravo y Sumar (1989) registraron que el tiempo transcurrido entre dos folículos en dominancia consecutivos fue de 12 días, para alpacas. En alpacas vacías criadas en las condiciones de Australia, se ha descrito que el IIO promedio fue 15.4 ± 0.5 días; en donde la frecuencia en intervalos de 12 días fue del 39% y de 16 días el 32%, inclusive registrándose intervalos de 18 a 22 días. Estos datos demuestran como el IIO promedio no se puede describir con precisión en un animal individual. Esta falta de consistencia del IIO también la podemos observar en otras especies de ovuladores inducidos; como las gatas domésticas (no estimuladas), en donde la fase folicular dura 6 días en promedio, pero el rango es de 3 a 16 días es amplio (Shille *et al.*, 1979). Sin embargo, en camellos dromedarios se ha reportado que el IIO es consistente dentro de cada individuo; ello se traduce en una alta repetibilidad (0.88), pero esta constituye una característica muy variable entre animales distintos (Manjunatha *et al.*, 2012).

Se ha descrito que un intervalo interonda largo se asocia con un mayor diámetro máximo del folículo dominante tanto en alpacas y llamas; según lo descrito por Vaughan *et al.* (2004) y Adams *et al.* (1990), respectivamente. Se presume que ello es posible debido a que los folículos más grandes suprimen la secreción hipofisiaria por más tiempo de FSH, dando como consecuencia un mayor

intervalo interonda (Vaughan *et al.*, 2004), fenómeno similar a lo observado en vacas (Ginther *et al.*, 1996). Sin embargo, ello no logra aclarar en vicuñas el reducido intervalo interonda reportado, dónde el diámetro máximo del folículo dominante es similar al descrito en alpacas (Miragaya *et al.*, 2004).

El aumento del intervalo interonda onda de la llama, 18 ± 2.6 días (Chaves *et al.*, 2002) en relación a la alpaca, 12 a 16, es probablemente porque el diámetro promedio del folículo dominante en la llama, 9 a 16 mm de diámetro, es mayor que en alpacas, 7 a 12 mm (Adams *et al.*, 1991a; Vaughan *et al.*, 2004). Además; se ha descrito que este diámetro no depende del peso vivo, en la alpaca. La hipótesis según la cual el aumento del diámetro del folículo dominante es responsable del mayor intervalo en dos ondas, podría deberse a variaciones interespecíficas e individuales dentro de una misma especie, lo cual puede dificultar el intento de predecir el momento óptimo de la monta o de la inseminación (Vaughan *et al.*, 2004).

2.2.8 Ovulación

La ovulación en los mamíferos implica una secreción pulsátil de GnRH desde el hipotálamo al sistema portal hipofisario, seguido de la liberación de LH desde la adenohipófisis a la circulación sistémica; en base a ello, la clasificación de las especies en ovuladores espontáneos o inducidos se basa en el tipo de estímulo responsable de provocar la liberación de GnRH del hipotálamo (Karsch *et al.*, 1997). Los camélidos sudamericanos (CSA) son considerados como especies de ovuladores inducidos (Fernández Baca, 1970a) como la coneja, gata y hurones. El mecanismo por el cual se libera LH es desencadenado por el estímulo de la cópula o de forma artificial a través de la aplicación exógena de análogos hormonales de función similar a la hormona luteinizante. Se ha reportado que el tiempo requerido desde la cópula hasta la ovulación bordea las 30 h (24 - 48 h), tanto en alpacas (San-Martin *et al.*, 1968) como en llamas (Huanca *et al.*, 2001). Además, en alpacas se ha observado una tasa de ovulación espontánea aproximadamente del 5 al 10 % (Fernandez-Baca *et al.*, 1970a); ello se produce también cuando existe un contacto físico de machos y hembras, o como una consecuencia de la manipulación del tracto reproductivo durante las evaluaciones ecográficas transrectales (Ratto *et al.*, 2003).

En los CSA; por muchos años se pensó que la cópula intracorneal era el estímulo necesario para desencadenar la ovulación (Fernández-Baca *et al.*, 1970a). Este concepto empezó a debatirse a

partir de dos trabajos publicados en 1985; cuando ya se intuía de un elemento en la porción plasmática del semen a partir de estudios desarrollados por investigadores en China en camellos bactrianos en los que se logró inducir exitosamente la ovulación a partir del depósito de semen vía intravaginal (Xu *et al.*, 1985) y a través de la administración vía intramuscular de plasma seminal (Chen *et al.*, 1985). Años más tarde, se pudo lograr aislar y purificar en la porción plasmática del semen al factor inductor de la ovulación (FIO) en camellos bactrianos (Pan *et al.*, 2001). En alpacas y llamas, se reportó la existencia un potente factor en el plasma seminal (FIO), que sería capaz de provocar un aumento en las concentraciones circulantes de LH y replicar de esta forma la ovulación y una acción luteínica eficaces (Ratto *et al.*, 2005), además se pudo caracterizar al FIO y se en donde Ratto *et al.* (2012) lograron identificarlo como un factor estimulante de crecimiento nervios β (β -NGF).

La ovulación ocurre como consecuencia de una interacción dinámica entre el pico preovulatorio causado por la LH y los factores ováricos locales; donde en un inicio, los folículos preovulatorios morfológicamente se caracterizan por presentar una fina red vascular elaborada que se localiza entre las células de la teca de los folículos preovulatorios, llegando a ser próximos a las capas de las células de la granulosa. Facilitando así a través de ella, el suministro de nutrientes y hormonas por difusión gracias a un flujo bidireccional entre las células de la granulosa y la red de capilares (Acosta y Miyamoto, 2004). Gracias a ello, luego de la oleada ovulatoria de gonadotropinas, el flujo sanguíneo aumenta hacia todos los folículos; sin embargo, el folículo dominante recibe el mayor volumen de sangre en términos absolutos (Hafez y Hafez, 2002).

El pico de LH provoca cambios estructurales y bioquímicos, que dirigen a la ruptura del folículo ovulatorio, teniendo como consecuencia, la expulsión del ovocito y el desarrollo subsecuente del cuerpo lúteo. Son varias cubiertas tisulares que aíslan al ovocito de una matriz extrafolicular; de afuera hacia adentro tenemos: Una capa de epitelio de tipo superficial, una capa albugínea fibrosa (con abundancia de colágeno), las capas de las células de la teca, la membrana basal (capa delgada que separa la red vascular de la membrana granulosa) y la membrana granulosa; las que contribuyen en brindar elasticidad y resistencia a la pared folicular. Previo a la ovulación, todas las cubiertas tisulares inician su desintegración y precisamente es la prostaglandina $F2\alpha$ ($PF2\alpha$) la responsable de estimular, en primera instancia, la activación de los fibroblastos de la teca para que se multipliquen e inician la liberación de una batería enzimática con actividad proteolítica que logren degradar todas las capas que recubren al ovocito; y en una segunda instancia, la $PF2\alpha$ logra estimular las contracciones de la musculatura lisa de la teca externa y del estroma ovárico contribuyendo a la extrusión completa del ovocito (Hafez y Hafez, 2002). Otro proceso clave que es inducido por la LH,

es la adición de grupos fosfatos a la proteína conexina Cx43 y con ello estimular su transformación, evento que conllevará con la desaparición de las uniones tipo gap y consecuente interrupción de los puentes entre células; paralelamente se estimula la separación de la granulosa del ovocito lo cual ayudara a liberarse del *cumulus* lo cual es importante para la expulsión del ovocito del folículo ovulatorio y posterior captura del ovocito por las fimbrias (Adams *et al.*, 2008). A pesar de los intensos efectos estimuladores de la LH entorno a la ovulación, las células del *cumulus* y el ovocito expresan poco o ningún receptor para esta hormona; siendo por la tanto insensibles a la estimulación directa de la LH. La acción de la LH parece ser mediada por proteínas relacionadas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los cuales son capaces de propagar el estímulo de la LH a través de las vías autocrina y paracrina (Park *et al.*, 2004).

El inicio del mecanismo de la ovulación como un reflejo al apareamiento, necesita la existencia de un folículo en dominancia con un diámetro ≥ 7 mm en crecimiento (Adams *et al.*, 1990). Las fallas en la ovulación relacionadas con los bajos niveles de LH han sido descritas en alpacas y llamas; donde según lo reportado por Bravo *et al.* (1991) se observó que después de la monta, las hembras con folículos pequeños (4-5mm) lograron liberar poca cantidad de LH; por el contrario, hembras con folículos ≥ 7 mm liberaron mayores cantidades de LH capaces de lograr estimular la ovulación y el desarrollo de una actividad luteal normal. Además, se reportó en este trabajo que un folículo preovulatorio en fase de regresión, los niveles LH se asocian con la regresión luteal y no con la ovulación; por lo tanto, se produjo un retraso en el surgimiento de un nuevo folículo en dominancia de 5 a 7 días. Así mismo; se ha reportado en bovinos y ovinos que las fallas en la respuesta a la ovulación posparto son debido a una reducción de los niveles de LH, esto como una consecuencia del balance energético negativo en el animal; lo que impide con ello que se produzca un pico preovulatorio de LH eficaz que induzca la ovulación (Schillo, 1992).

2.2.9 Cuerpo lúteo

El desarrollo de un cuerpo lúteo (CL), funcional, es indispensable para el sostenimiento de la gestación tanto en alpacas como llamas. En alpacas no preñadas, el CL experimenta un rápido crecimiento luego de la ovulación, el primer aumento de la concentración plasmática de progesterona se observa de 3 a 4 días posmonta (Sumar, 1988), alcanzando su máximo tamaño (14 mm de diámetro) y actividad secretora a los 7 a 9 días, para regresionar bruscamente de tamaño a los 11 a

13 días después del empadre (Fernandez Baca *et al.*, 1970b). En llamas no preñadas, luego de la ovulación el CL logra su máximo tamaño el día 6 con 12.8 ± 0.3 mm de diámetro (Adams *et al.*, 1991). La presencia de una concentración plasmática de progesterona mayor a 0.32 nmol/L en alpacas (Sumar, 1988) evidencia actividad luteal; la que explica la falta de receptividad sexual en hembras (Fernández Baca, 1970b). El diámetro que puede alcanzar el CL no depende del tamaño del folículo preovulatorio ni de su estado de crecimiento o regresión, antes de su ovulación (Ratto *et al.*, 2011).

La rápida disminución de la secreción de progesterona ocurre luego de un patrón pulsátil de liberación de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) endógena durante la degeneración del cuerpo lúteo en alpacas que no lograron la preñez (Sumar, 1988). En ese contexto, se ha descrito en llamas que la liberación luteolítica de la $PGF2\alpha$, de origen uterino, se inició el día 7-8 posmonta (aproximadamente 5-6 días después de la ovulación) y se completó su liberación el día 9-10 (Aba *et al.*, 2000); llegando en conjunto estos trabajos a sugerir a la $PGF2\alpha$ como el principal agente luteolítico en camélidos sudamericanos. Los niveles de progesterona circulante disminuyen de 1 a 3 días antes que el inicio de la regresión morfológica del CL (Aba *et al.*, 2000).

Un apareamiento fértil en llamas da lugar a la formación de un CL que se mantiene funcional en el transcurso de toda la gestación, el cual ya puede ser detectado por ultrasonografía transrectal el día 3-4 (Adams *et al.*, 1991). se ha descrito una disminución transitoria y posterior recuperación en la concentración plasmática de progesterona entre los días 7 y 10 de la preñez temprana periodo que coincide con un lento aumento transitorio (desde el día 3 al 8 posmonta) de la concentración plasmática del 17β -estradiol (Aba *et al.*, 2000). El CL alcanza su tamaño máximo el día 21.4 ± 1.2 pos-ovulación (Adams *et al.*, 1991) y mantiene una elevada concentración plasmática de progesterona elevada hasta aproximadamente 2 semanas antes del parto, después disminuye lentamente y finalmente cae marcadamente su concentración alrededor de un día antes del parto (Leon *et al.*, 1990).

El desarrollo de un CL funcional, luego de la ovulación, no interrumpe una nueva emergencia folicular; de esta forma tenemos que a pesar del desarrollo luteal, un nuevo folículo dominante se observa a los 2 días (rango, 1 a 5 días) pos-ovulación (Ratto *et al.*, 2003). Sin embargo, los niveles circulantes de progesterona en animales gestantes y la lactación reducen ligeramente el intervalo entre folículos dominantes sucesivos en 2.5 días. Además, la existencia del cuerpo lúteo en animales no gestantes se asoció con una reducción en el número de folículos en promedio en llamas (Adams *et al.*, 1990).

Así mismo, investigaciones han reportado una asociación significativa entre la concentración basal de progesterona circulante y el número de folículos antrales (NFA), en ellos se describió que vacas con bajo NFA presentaron menores concentraciones de progesterona en circulación (Ireland *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2015); se presume que esto es debido a una capacidad disminuida de las células luteales y de la granulosa para sintetizar progesterona (Jimenez-Krassel *et al.*, 2009).

2.3 Repetibilidad

La repetibilidad, también denominada coeficiente de correlación intraclase (CCI), es una prueba estadística que cuantifica la concordancia que tienen las mediciones repetidas de un mismo carácter, en idénticas condiciones, dentro de un mismo individuo. Generalmente se la denomina como r y su valor se expresa como una proporción, cuyos valores pueden oscilar entre 0 y 1 en donde un valor de 1 indica que la medida es perfectamente repetible (concordancia absoluta); y un valor de 0 indica que las medidas obtenidas de ese carácter son tan distintas como si hubiesen sido tomadas de individuos distintos. Se considera que un carácter es repetible si presenta un valor de r mayor de 0.70 (Harper, 1994) basado en los intervalos de referencia de Martin y Bateson (1986).

Cuadro 1. Valoración de la repetibilidad según intervalos

Intervalos	Repetibilidad (r)
r mayor que 0.90	Muy alta
r entre 0.71 y 0.90	Alta
r entre 0.41 y 0.70	Moderada
r entre 0.21 y 0.40	Baja
r menor que 0.20	Leve

Adaptado de: Martin y Bateson (1986)

La evaluación de la repetibilidad de un carácter puede ser muy variable, los factores implicados en esa variabilidad son los siguientes: El tamaño de los caracteres, el rango de variación de la medida, el grado de precisión del equipo empleado y la facilidad de tomar la medida (Harper, 1994).

La determinación directa del número total de folículos antrales (NFA) visibles por ultrasonografía es un buen predictor del número de folículos y de ovocitos morfológicamente sanos presentes en los ovarios (Ireland *et al.*, 2008). Sin embargo, esta es una característica altamente variable entre especies distintas (Ireland *et al.*, 2007). A pesar de ello, se ha podido determinar en especies como los bovinos (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Shahzad *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017) y camellos dromedarios (Manjunatha *et al.*, 2012) que el NFA representa una característica altamente repetible en un mismo individuo. Por lo tanto; se demostró la posibilidad de seleccionar hembras mediante ultrasonografía basado en la repetibilidad del NFA; debido a su alto grado de repetibilidad individual, independientemente de su edad, raza, época del año, estado de lactación o de su condición de gestación (Burns *et al.*, 2005).

Según Burns *et al.* (2005) el NFA determinados durante la emergencia folicular presentó una repetibilidad muy alta ($r=0.96$) en una población de vaquillas lecheras; de similar forma, Gobikrushanth *et al.* (2017) determinaron una mayor repetibilidad ($r=0.95$) en el NFA ≥ 2 mm de diámetro en vacas lecheras durante la emergencia de crecimiento folicular, en comparación con una baja repetibilidad ($r=0.37$) durante estadios foliculares aleatorios. Ireland *et al.* (2007) reportaron una repetibilidad de 0.84 del NFA en vaquillas de carne. En búfalos, Shahzad *et al.* (2014) concluyeron que la repetibilidad del NFA ≥ 3 mm durante crecimiento folicular fue alta ($r=0.85$) entre diferentes ciclos estrales. En camellos dromedarios el NFA ≥ 4 mm diámetro durante la emergencia folicular es altamente repetible ($r=0.95$) dentro de un mismo animal, y muy variable entre animales diferentes (Manjunatha *et al.*, 2012).

2.4 Técnicas de asistencia reproductiva

2.4.1 Ultrasonografía del aparato reproductivo

El inicio del uso del ultrasonido como una herramienta de investigación transformó los conceptos establecidos en relación a la fisiología ovárica, y en particular en unos de sus aspectos más resaltantes, la dinámica folicular (Peter *et al.*, 2009). Según González-Bulnes *et al.* (1994) la eficiencia de los estudios sobre la dinámica folicular por ultrasonido dependen de los siguientes factores: Identificación de la posición de los ovarios, la observación total de los folículos y la determinación de su diámetro. Diversos estudios han descrito que mediante la evaluación por ultrasonido transrectal, se pudo detectar del 79.8% (González-Bulnes *et al.*, 1994) al 73,9% (Contreras *et al.*, 2007) del número total de folículos determinados por observación *post mortem*. En donde se destaca que el tamaño límite mínimo de detección para los folículos podría estar alrededor de un diámetro de 2 mm; pues según lo descrito por Viñoles *et al.* (2004) el porcentaje correctamente detectado fue de 62% para aquellos folículos de 2 mm de diámetro y del 95 % para los folículos con 3 mm de diámetro.

La exploración por ultrasonido en tiempo real (modo B) ha demostrado ser una técnica muy útil para una evaluación completa del aparato reproductivo en camélidos sudamericanos (CSA) (Parraguez *et al.*, 2010; Cebra *et al.*, 2014), diagnóstico de preñez, estimación de la edad del feto, evaluación del crecimiento y viabilidad fetal. Además, permite una descripción de la dinámica folicular y uterina, detección de la ovulación, evaluación de los tratamientos de superovulación, aspiración folicular (Parraguez *et al.*, 2010) y el diagnóstico de varias anomalías del aparato reproductivo (Cebra *et al.*, 2014).

El examen del tracto reproductivo se puede realizar por evaluación transrectal o transabdominal, pero el método transrectal es el preferible. Para su uso, un transductor lineal con una sonda convexa en una frecuencia entre 5 a 7.5 MHz garantizan una imagen clara y bien definida con suficiente penetración en profundidad para examinar la totalidad del tracto reproductivo en CSA (Parraguez *et al.*, 2010). Así por ejemplo, Bravo *et al.* (1990) ecografiaron transrectalmente llamas a través de un transductor de 5 MHz en donde el tamaño más pequeño de los folículos considerados estuvo en ≥ 3 mm (de diámetro), tamaño mínimo de detección de folículos similar al empleado por Vaughan *et al.*, (2004) en alpacas. En alpacas, los ovarios son más fáciles de ubicar y ecografiar

cuando el animal se encuentra en una posición decúbito esternal, posición que comúnmente adquieren las alpacas durante el examen rectal (Adams *et al.*, 1989).

A través de la ecografía transrectal, en el ovario se exhiben los folículos como estructuras redondas y anecoicas, cuando se compararon con el estroma ovárico ecogénico (Schrick *et al.*, 1993), los folículos se encuentran distribuidos en toda la prolongación de la periferia del ovario; sobresaliendo con facilidad aquellos folículos grandes (Adams *et al.*, 1989; Parraguez *et al.*, 2010). En donde el número de folículos antrales (NFA) representa el número total de folículos ováricos visualizados por ultrasonografía en ambos ovarios (Shahzad *et al.*, 2014).

La identificación ultrasonográfica del cuerpo lúteo es sencilla a partir de los 4 días luego de la ovulación (Sumar, 1999). El cuerpo lúteo se visualiza como una estructura hipocogénica con una zona central más ecogénica. Ciertos cuerpos lúteos cuentan con una cavidad central (antro), anecoica, repleta de líquido y que diametralmente presenta de 3 a 8 mm (Adams *et al.*, 1991) llegando a protruir de la superficie aquellos cuerpos lúteos de gran tamaño (Adams *et al.*, 1989).

Las características ecogénicas en los cuernos uterinos varían según el estadio reproductivo de la hembra. Así; en la fase folicular, al existir un claro predominio de estrógenos en el organismo se nos permite distinguir una imagen hipocogénica, oscura, la cual es indicativa de un incremento del fluido intercelular (edema). Por el contrario, en una fase luteal establecida y en el inicio del desarrollo de la gestación la imagen ecográfica, de los cuernos uterinos, es isoecoica al tejido circundante. Los oviductos, de forma normal, no son visibles por ecografía (Parraguez *et al.*, 2010).

2.4.2 Sincronización hormonal de la dinámica folicular

La sincronización de la dinámica folicular es el resultado del control del desarrollo folicular a través de la ovulación inducida (Martinez *et al.*, 2000). Según Miragaya *et al.* (2006) la sincronización folicular pretende: Predecir la aparición de un nuevo folículo preovulatorio en un programa de empadre o inseminación artificial, iniciar tratamientos superovulatorios en ausencia de folículos preovulatorios y sincronizar donantes/receptoras en programas de transferencia embrionaria. La sincronización se puede realizar a través de métodos hormonales y no hormonales (Hanzen *et al.*, 2014). Por ejemplo, la cópula de una hembra con un macho vasectomizado puede inducir la ovulación 24 a 48 horas después, en alpacas (San-Martin *et al.* 1968) y entre 30 a 48 horas en llamas (Bravo y

Sumar, 1989; Bravo *et al.*, 1990). Así mismo; es posible inducir la ovulación de forma mecánica por el método de ablación folicular ecoguiada (Boni *et al.* 1997), logrando así el desarrollo de un nuevo folículo dominante a los 5 ± 0.5 días (Ratto *et al.*, 2003).

La inducción de la ovulación en folículos ≥ 7 mm de diámetro en CSA es posible por métodos hormonales a través de la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Sumar, 1994), de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (buserelina) (Sumar, 1985; Andrade, 2007), de la hormona luteinizante (LH) (Huanca *et al.*, 2001) y del plasma seminal diluido entre las 24 a 48 horas después de su aplicación. Asimismo; Ratto *et al.* (2003) reportaron el uso eficiente de progesterona y progestagenos para controlar la dinámica folicular en llamas.

La buserelina es un análogo sintético de la GnRH que es 20 veces más potente que la hormona natural y es más resistente a la proteólisis; esta molécula se une con gran afinidad al receptor de GnRH ubicado en las células de la pituitaria anterior, donde logra estimular la secreción de LH y FSH. Luego de su aplicación intramuscular (IM) la buserelina posee una vida media, aproximada, de 80 minutos; logrando alcanzar su mayor concentración sérica a la hora de ser aplicada (Furman, 2017).

La habilidad de la GnRH, natural o sintética, para sincronizar la dinámica folicular ha sido descrita en varios estudios. La ovulación puede ser inducida satisfactoriamente por la inyección IM de 4 μg de buserelina (Sumar, 1985; Huanca *et al.*, 2001; Andrade, 2007; Palian, 2010) cantidad notablemente menor, en comparación con los 1000 μg de GnRH natural empleados por Bravo *et al.* (1992) para inducir la ovulación en alpacas. Ferrer *et al.* (2002) reportaron que la administración IM de buserelina resultó efectiva para la sincronización de la emergencia folicular durante distintos estadios de la dinámica folicular (crecimiento, estática y regresión); y, se logró determinar que el tiempo transcurrido desde la aplicación de la buserelina hasta la aparición de un nuevo folículo ≥ 7 mm fue de $5,5 \pm 1,8$ días. Andrade (2007) observaron, en alpacas, que luego de la aplicación de 1 ml (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de buserelina IM el intervalo hasta la tasa de emergencia de una nueva onda folicular fue de 4.3 ± 1.4 días. La tasa de ovulación de la buserelina, administrada vía IM, fue reportada $\geq 90\%$ (Andrade, 2007; Palian, 2010), inclusive llegando al 100% (Huanca T, 2008) en alpacas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración

El presente trabajo fue realizado durante el primer trimestre del 2016, en el Centro de Investigación y Producción (CIP) Chuquibambilla, institución que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano; ubicada a 3950 msnm, en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar, región Puno y la cual es considerada zona agroecológica de puna húmeda.

3.2 Animales

La población de estudio la constituyeron 34 alpacas suri adultas. Las cuales se mantuvieron separadas de los machos, todos los ejemplares estuvieron sujetos a similares condiciones de manejo, fueron provistos de pastos naturales y tuvieron acceso al agua *ad libitum*; todo ello en terrenos del CIP Chuquibambilla.

Los criterios de inclusión en la selección de los animales fueron: Grupo etéreo comprendido entre los 4 y 7 años, antecedentes reproductivos conocidos, condición corporal ≥ 2.5 (escala de 1-5), con un apropiado tamaño corporal que permita su evaluación transrectal y que presentaran un folículo ≥ 7 mm (diámetro). Los criterios de exclusión fueron: hembras preñadas o con cría al pie, ejemplares que estén siendo suplementadas con hormonas, antecedentes de cirugías ováricas, animales con defectos congénitos y/o adquiridos.

3.3 Determinación del número de folículos antrales

Los ovarios fueron escaneados por ecografía transrectal (Aloka SSD-500, Aloka Co Ltd., Tokyo, Japan), en modo B y con un transductor lineal de 5 MHz; todas las ecografías fueron realizadas cada dos días por un único operador por un periodo de hasta 60 días. El escaneo de los ovarios fue de extremo a extremo y la posición de los folículos antrales fue graficada en el ovariograma (Anexo 1) para analizar su número y desarrollo folicular. El tamaño de los folículos fue calculado promediando sus diámetros longitudinal y transversal.

El número de folículos antrales se definió como la cantidad total de folículos ≥ 3 mm de diámetro visibles por ultrasonográfica en ambos ovarios. Para determinar la repetibilidad del número de folículos antrales por alpaca, cada animal fue evaluado durante la emergencia de tres ondas foliculares consecutivas.

3.4 Procedimiento metodológico

Se realizaron evaluaciones por ultrasonografía transrectal en 55 animales durante 4 días previos a la selección y en base a ello se seleccionaron 34 alpacas que cumplieron los criterios de inclusión. Posteriormente, las alpacas fueron distribuidas en dos grupos de similar número previa identificación con collarines, número de arete y marca de color (rojo o azul) en el cuello. Se procedió a dividir en grupos para reducir el estrés por el manejo y la manipulación en los animales; además ello proyectó favorecer un mayor periodo destinado al pastoreo en las alpacas.

Partiendo del principio de que la existencia de un folículo en dominancia representa un factor de inhibición de un crecimiento folicular múltiple (Vaughan *et al.*, 2004), se sincronizó la emergencia folicular a través de la aplicación de 1 ml análogo de GnRH (4.2 μ g de acetato busarelina)(Conceptal®, Intervet. Alemania) vía inyección intramuscular (músculo semimembranoso) con una aguja de 20 x 1½ según el trabajo de Adams *et al.* (2005). El estímulo hormonal (D_0 = día cero) se aplicó para inducir la ovulación en los animales. Dos días después de su sincronización, se empezó un seguimiento ecográfico transrectal por individuo; procurando evidenciar que se haya producido la ovulación, la cual fue establecida como la desaparición de un folículo dominante que fue previamente registrado. Por otro lado, todos los exámenes ecográficos

fueron ejecutados a tempranas horas de la mañana (06:00 h), luego del cual se trasladaron a las alpacas a sus corrales para que puedan alimentarse.

En ambos grupos de estudio, todos los folículos ≥ 3 mm fueron medidos diametralmente (la imagen ecográfica de los folículos antrales correspondió a estructuras anecogénicas) y se registró gráficamente en ovariogramas independientes su número, tamaño, forma y posición de las estructuras ováricas observadas (Anexo 1). El día de la emergencia folicular fue considerado como el día en que el nuevo folículo dominante presentó, retrospectivamente, un diámetro ≥ 4 mm (Adams *et al.*, 1990; Manjunatha *et al.*, 2012).

Se evaluó el número de folículos antrales ≥ 3 mm (diámetro) durante días aleatorios (días, 12 y 24) del crecimiento folicular para poder compararlos con el número de folículos antrales durante días esperados de la emergencia folicular, según la metodología propuesta por Gobikrusthant *et al.* (2017) en vacas. Los días fijos 12 y 24 fueron elegidos tomando como referencia el trabajo de Vaughan *et al.* (2004) en donde se espera para el día 12 la emergencia de una nueva onda folicular luego de la sincronización hormonal y para el día 24 suceda una subsiguiente emergencia folicular.

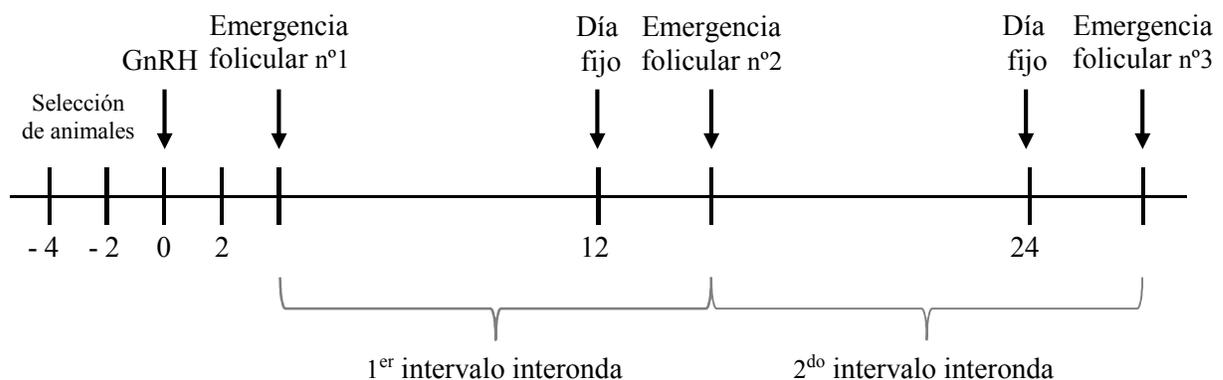


Figura 2. Diseño observacional

Como una parte preanalítica del presente estudio observacional, los siguientes parámetros fueron considerados:

- Tasa de ovulación
- Día de la emergencia folicular
- Día de aparición del folículo dominante ≥ 7 mm
- Diámetro máximo del folículo dominante
- Día de detección del cuerpo lúteo
- Día de desaparición del cuerpo lúteo
- Diámetro máximo del cuerpo lúteo

3.5 Análisis estadístico

El presente es un estudio no experimental de tipo prospectivo. Se determinaron las medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar, rango). La distribución normal del número de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm de diámetro y del intervalo interonda (IIO) fueron analizados mediante la prueba de D'Agostino-Pearson (Anexo 2 y 3). Se emplearon las pruebas de Mann-Whitney para identificar diferencias significativas en el NFA entre la emergencia folicular y un periodo aleatorio de crecimiento folicular; y la prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas en el NFA ≥ 3 mm entre alpacas individuales, entre emergencias foliculares sucesivas y entre las categorías de clasificación por animal. La repetibilidad (rango 0 - 1; donde 1 es una repetibilidad perfecta) fue calculada para el NFA ≥ 3 mm y el IIO; como un paso previo, los datos se normalizaron mediante el cálculo de su raíz cuadrada (se informan los valores transformados) (Anexo 3 y 4). Se empleó el programa estadístico SPSS versión 24 (IBM Inc. Chicago USA, 2016), y se consideraron que las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Tasa de ovulación

El diámetro promedio de los folículos preovulatorios ≥ 7 mm al inicio del estudio fue de 9.3 ± 1.79 mm (Rango 7 - 14). Luego de la aplicación de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), para la sincronización de la onda folicular, se obtuvo una tasa de ovulación del 100% (34/34) en las alpacas en estudio; luego de la ovulación se observó que la localización de los nuevos folículos dominantes fue similar entre el ovario izquierdo (n=18) y derecho (n=16). Con respecto a la alternancia de los folículos dominantes durante las tres ondas foliculares evaluadas, se observó que 14/34 (41%) alpacas presentaron una alternancia en la emergencia de los nuevos folículos dominantes.

4.2 Intervalo desde la sincronización hasta la emergencia folicular

El cuadro 2 muestra el intervalo desde la administración de un análogo de GnRH hasta el desarrollo de una emergencia folicular. No se reportaron emergencias foliculares el día 10 post sincronización; sin embargo, se presentaron 3 animales que tuvieron la emergencia de sus ondas foliculares hasta llegado el día 12 post sincronización.

Cuadro 2. Día de la emergencia folicular post sincronización

	n	Media ± D.E.	Rango
Intervalo desde la sincronización hasta la emergencia folicular (días)	31	4.5 ± 1.4	2 – 8

4.3 Intervalo desde la sincronización hasta el día que el folículo alcanzo el tamaño preovulatorio.

El cuadro 3 muestra el intervalo en días desde la aplicación de un análogo de GnRH hasta el día en que el folículo dominante de la nueva onda folicular alcanzó un tamaño preovulatorio (≥ 7 mm de diámetro) y el máximo tamaño de folículo dominante (mm).

Cuadro 3. Día de aparición del folículo preovulatorio ≥ 7 mm post sincronización y diámetro máximo del folículo dominante

	n	Media ± D.E.	Rango
Intervalo desde la sincronización hasta alcanzar el tamaño preovulatorio (días)	34	9.3 ± 2.6	10 – 18
Diámetro máximo del folículo dominante (mm)	68	10.7 ± 1.9	7 – 16

4.4 Cuerpo lúteo

En el cuadro 4 se muestran las características del cuerpo lúteo durante el desarrollo de una fase luteal natural generada luego de la ovulación. Los caracteres como el día de detección del cuerpo lúteo (CL), el máximo diámetro (en mm) alcanzado y la duración del CL son expresados a través de medidas de tendencia central y dispersión.

Cuadro 4. Características del cuerpo lúteo durante una fase luteal natural inducida

	Media \pm D.E.	Rango
Día de detección del CL	5.8 \pm 1.4	2 - 8
Máximo diámetro del CL (mm)	12.6 \pm 1.5	8.8 – 15.5
Duración del CL (días)	13.4 \pm 1.9	10 - 18

CL Cuerpo lúteo

4.5 Número de folículos antrales ≥ 3 mm

En la figura 3 se presenta la distribución del número folículos antrales (≥ 3 mm de diámetro) representados a través del histograma acompañada de la curva normal de los datos. Como se observa en la Figura 4, se evaluó el número de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm promedio durante las tres emergencias foliculares sucesivas evaluadas a través de la prueba la prueba de Kruskal-Wallis (Anexo 6). El NFA ≥ 3 mm fue comparado entre alpacas individuales en estudio según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes (Anexo 7). Las medidas de tendencia central y de dispersión del NFA ≥ 3 mm determinados durante un día esperado de la emergencia folicular y un periodo desconocido de crecimiento folicular (días fijos 12 y 24) en las 34 alpacas, estos datos se representaron en el cuadro 5 y se evaluaron a través de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Anexo 8).

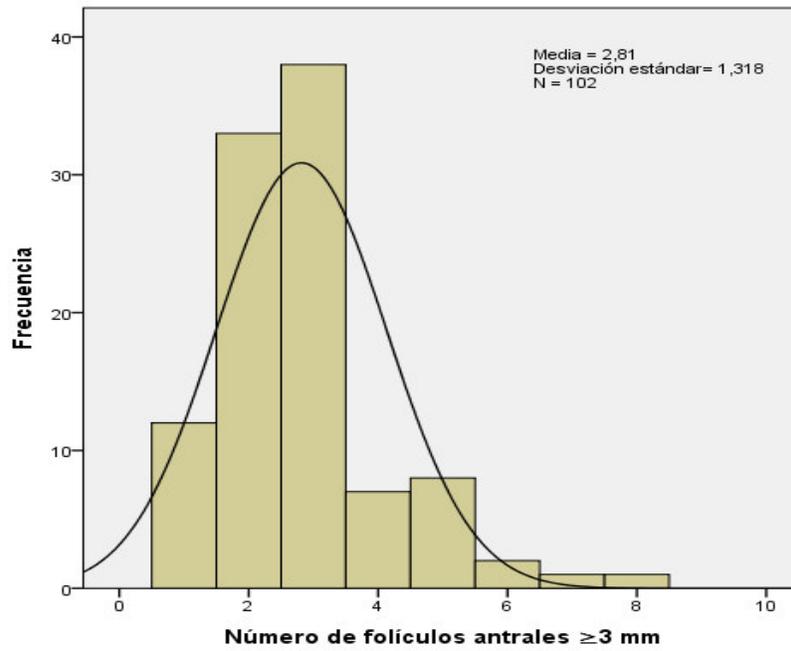


Figura 3. Distribución del número de folículos antrales ≥ 3 mm determinados durante la emergencia folicular

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

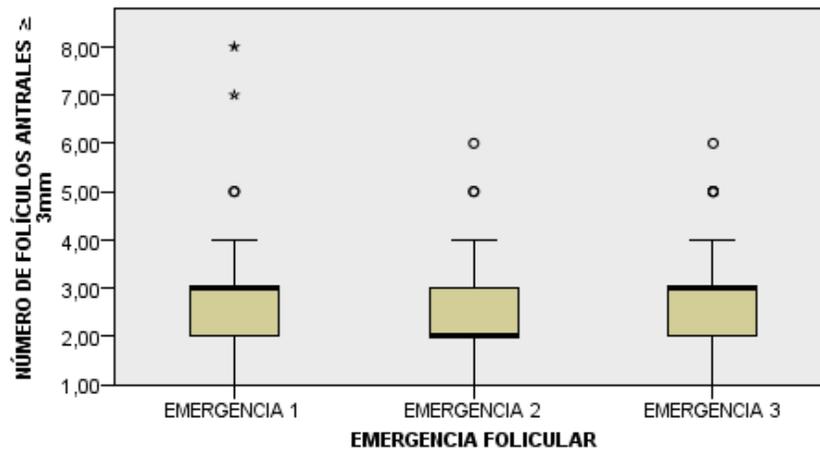


Figura 4. Número promedio de folículos antrales ≥ 3 mm entre emergencias foliculares

Cuadro 5. Número de folículos ≥ 3 mm durante la emergencia folicular y un periodo aleatorio (días 12 y 24) de crecimiento folicular

Número de folículos antrales ≥ 3 mm		
	Emergencia	Aleatorio
Rango	1 - 8	1 - 6
Media \pm D.E.	2.8 \pm 1.3	3.2 \pm 1.6
Mediana \pm RIC	3 \pm 1 ^a	3 \pm 2 ^a

^a Letras distintas en una misma fila indican diferencia significativa
 RIC Rango intercuartil
 Mann-Whitney ($P > 0.05$)

4.6 Repetibilidad del número de folículos antrales ≥ 3 mm

El cuadro 6 muestra la repetibilidad del número de folículos antrales (≥ 3 mm de diámetro) determinada durante un día esperado de la emergencia folicular y durante un periodo aleatorio de crecimiento folicular (días fijos 12 y 24), dentro de los mismos animales en estudio (Anexos 9 y 10).

Cuadro 6. Repetibilidad del número de folículos antrales ≥ 3 mm

Número de folículos antrales ≥ 3 mm		
	Emergencia	Aleatorio*
Repetibilidad	0.72	0.20
Periodos evaluados	102	68

NFA Número de folículos antrales

* Días fijos 12 y 24

4.7 Clasificación de alpacas según su número folículos antrales ≥ 3 mm

En el cuadro 7 se observa cómo las 34 alpacas fueron clasificados en tres categorías diferentes según el valor promedio del número de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm, en donde las categorías propuestas fueron: alto (NFA > 3), intermedio ($3 \geq$ NFA > 2) y bajo ($2 \geq$ NFA). Se determinó que el NFA promedio es muy significativamente distinto entre las diferentes categorías de clasificación para alpacas ($P < 0.01$) (Anexo 11).

Cuadro 7. Clasificación de alpacas según su número promedio de folículos antrales ≥ 3 mm

Categorías	NFA (media \pm D.E.)	Alpacas (n)	Porcentaje (%)
Alto	4.3 \pm 1.6 ^a	8	24
Medio	2.7 \pm 0.6 ^b	16	47
Bajo	1.9 \pm 0.6 ^c	10	29
TOTAL		34	100

^{abc} Promedios en la misma columna con letra distinta indican diferencias estadísticas significativas

NFA Número de folículos antrales
Kruskal-Wallis ($P < 0.01$)

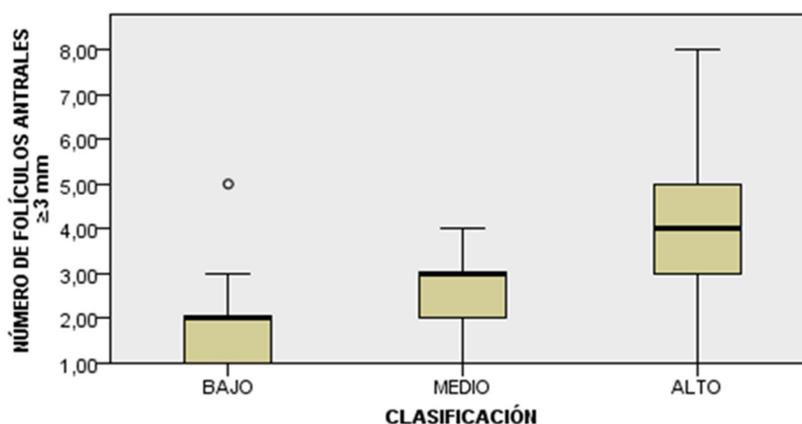


Figura 5. Clasificación de alpacas según su número de folículos antrales ≥ 3 mm

4.8 Intervalo interonda

El Intervalo interonda promedio \pm desviación estándar fue del 16.9 ± 3.9 días, respectivamente; en donde los mayores porcentajes de intervalos fueron aquellos con 14 (16%), 16 (18%) y de 18 (19%) días; inclusive registrándose intervalos de 20 a 24 días durante la evaluación de 68 ondas foliculares en 34 alpacas, la distribución de las frecuencias del intervalo interonda fue expuesto en la figura 6. Así mismo, se determinó que el intervalo interonda en alpacas presentó una repetibilidad de 0.23 (Anexo 12).

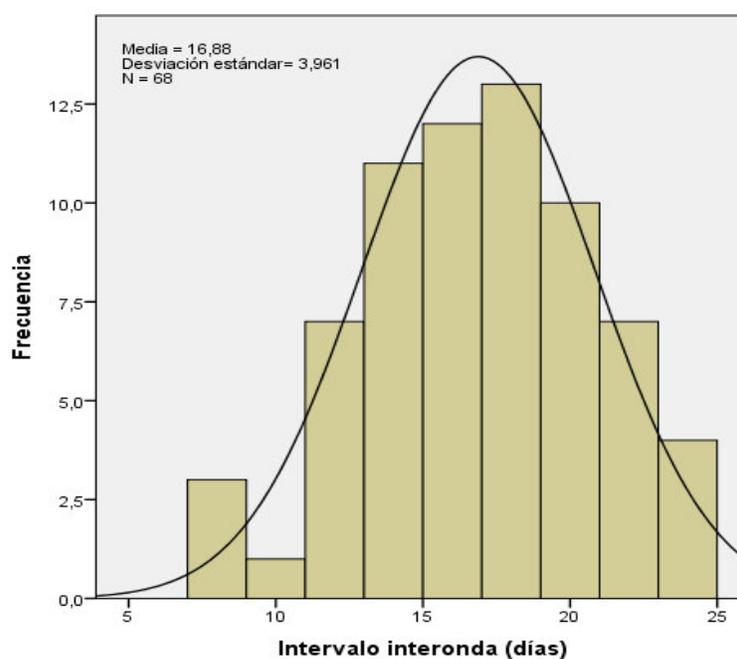


Figura 6. Distribución del intervalo interonda en días

V. DISCUSIÓN

Este estudio pretendió caracterizar la emergencia folicular y determinar la repetibilidad de la onda folicular en alpacas en base al número de folículos emergentes. Para ello, se procedió a la sincronización de la ovulación en alpacas adultas, para luego realizar un seguimiento ecográfico interdiario y un registro de su dinámica folicular individual. La aplicación de 4.2 µg de acetato de busarelina, vía intramuscular, estimula la descarga de LH a nivel de la adenohipófisis induciendo la ovulación y la consiguiente eliminación de la inhibición del folículo en dominancia sobre el desarrollo folicular; lo cual permitiría según Miragaya *et al.*, (2006) estimular una nueva emergencia folicular sincronizada, el crecimiento de un nuevo folículo en dominancia y el desarrollo de una fase lútea natural.

La estimulación hormonal con un análogo de GnRH logró obtener la ovulación y posterior desarrollo de un cuerpo lúteo en el conjunto total de ejemplares sincronizados (34/34); siendo esta tasa de ovulación similar a la descrita por Andrade (2007) y Huanca T (2008) en alpacas. La detección del cuerpo lúteo en promedio fue a los 5.8 ± 1.4 días, en donde se observó que estos promediaron un diámetro máximo de 14 mm y pudieron ser detectados hasta los 10 a 14 días luego de la sincronización; siendo estos resultados similares a los reportados en alpacas por Fernández-Baca *et al.* 1970b y Bravo *et al.*, 1991.

Luego de la ovulación, el desarrollo de un cuerpo lúteo no interrumpió el surgimiento de una nueva emergencia folicular, conforme a lo señalado por Ratto *et al.* (2003); ni logro ejercer un efecto significativo sobre el número de folículos antrales ≥ 3 mm durante la primera emergencia folicular

en comparación con las dos siguientes emergencias de las ondas foliculares (Figura 3); es decir, que a pesar del desarrollo luteal el número de folículos emergentes ≥ 3 mm fue similar durante las tres emergencias foliculares, esto según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($P > 0.05$) (Anexo 6)

El día esperado de la emergencia folicular se estimó como el día en que el folículo dominante presentó, retrospectivamente, un diámetro ≥ 4 mm en base a los estudios desarrollados por Adams *et al.* (1990) y Manjunatha *et al.* (2012). En base a ello, se definió que el intervalo desde la sincronización hasta la emergencia folicular fue de 4.5 ± 1.4 días (rango 2 – 8) en este estudio, siendo este resultado similar al reportado por Andrade (2007) en alpacas, quien empleó también un análogo de GnRH (4.2 μ g de acetato de buserelina) con el fin de sincronizar una nueva emergencia folicular, obteniendo un intervalo a la emergencia folicular de 4.3 ± 1.4 días. Se observó además que hubo 3 animales que presentaron un retraso en la emergencia folicular hasta el día 12 después de la sincronización, lo cual podría ser atribuido a que algunos folículos preovulatorios previos a la sincronización estuvieron en la fase de regresión en donde el efecto de la LH liberada podría favorecer la luteinización de los folículos sin que se logre producir la ovulación, resultando así en un retraso en la consecuente emergencia folicular de hasta 7 días en relación al promedio del grupo, siendo este fenómeno similar al descrito en llamas por Bravo *et al.*, 1990 y Bravo *et al.*, 1991.

En los animales en estudio, no se observó que exista un patrón alternante regular en la emergencia del folículo dominante entre el ovario izquierdo y derecho, pues 14/34 (41%) de los animales mostraron una alternancia folicular. Esto fue consistente con hallazgos previos en alpacas y llamas (San-Martin *et al.*, 1968; Vaughan *et al.*, 2004). Por el contrario, Bravo *et al.* (1991) han descrito la existencia de una alternancia folicular regular para el ovario izquierdo y derecho en un 80-85% de alpacas. El intervalo desde la sincronización al día en el cual un nuevo folículo alcanzó un tamaño preovulatorio ≥ 7 mm en alpacas a través de un análogo de GnRH (buserelina) fue de 9.3 ± 2.6 días, similar a lo descrito por Ratto *et al.* (2003) y Andrade (2007). Además, el tamaño promedio del folículo dominante fue 7 a 12 mm; el cual es similar al observado por Bravo y Sumar, (1989).

Para el desarrollo del análisis se asumió que el número de folículos emergentes ≥ 3 mm determinados por ultrasonografía transrectal reflejan la reserva de folículos primordiales disponible en una alpaca adulta, tomando de referencia los trabajos histológicos sobre la reserva ovárica realizados en vacas (Ireland *et al.*, 2008) y alpacas (Celiz, 2017). Apoyados en dichos estudios y en base a nuestras observaciones, se pudo describir que el número de folículos antrales ≥ 3 mm

durante la emergencia folicular en alpacas se caracteriza por presentar una distribución asimétrica en su histograma (figura 3), pues esta distribución revela que existe un gran número de animales que cuentan con un NFA bajo (1 a 3 folículos); y por el contrario, son pocos los ejemplares que poseen un valor alto (> 3 folículos) en su NFA. Para evaluar la naturaleza de dicha distribución de los folículos se usó la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson (Anexo 2), verificando de este modo que dicho carácter no sigue una distribución normal (Anexo 3). Esta asimetría en la distribución de los folículos emergentes constituye un rasgo común reportado en otras especies domesticas como los bovinos (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Shahzad *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017) y los camellos dromedarios (Manjunatha *et al.*, 2012); y como tal, podría explicar en parte la respuesta individual diversa de estas especies a los distintos protocolos de superovulación ovárica descritos hasta la actualidad.

Siendo el número de folículos antrales una característica que no presenta una distribución normal en alpacas, la medida de tendencia central empleada debería ser la mediana en lugar de la media; sin embargo, por fines comparativos en relación a otros estudios, ambos valores fueron cálculos y presentados en el presente trabajo (Cuadro 5). A partir de ello, se describió que el promedio (\pm D.E.) del número de folículos emergentes con un diámetro ≥ 3 mm fue de 2.8 ± 1.3 folículos, en donde por ejemplo hubo animales que presentaron solo un folículo durante las tres emergencias foliculares y por otra parte hubo animales que presentaron de cinco a más folículos emergentes durante las tres ondas, es así como se observó que el rango de folículos emergentes en alpacas está comprendido entre 1 a 8 folículos ≥ 3 mm (Figura 3). Este intervalo ilustra la gran variación para esta característica en las alpacas, hecho que fue descrito previamente por múltiples autores en otras especies de mamíferos como los bovinos (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Shahzad *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017) y los camellos dromedarios (Manjunatha *et al.*, 2012).

Con base en el registro individual de datos se identificó una notable similitud en el número promedio de folículos ≥ 3 mm (diámetro) durante las emergencias de las ondas foliculares sucesivas (Anexo 6); sin embargo, se determinó que existe una diferencia significativa en el número de dichos folículos entre animales distintos, esto según la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes ($P < 0.05$) (Anexo 7). En el mismo sentido, en el presente estudio se pudo distinguir que el número de folículos antrales (NFA) ≥ 3 mm durante la emergencia folicular y un periodo aleatorio (días fijos 12 y 24) de crecimiento folicular no difieren significativamente, según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Anexo 8); es decir, que el NFA ≥ 3 mm promedio es relativamente constante durante distintos periodos de desarrollo folicular entre los animales en estudio. Esto podría

ser explicado porque probablemente durante una etapa aleatoria de crecimiento folicular esté presente una población mixta de folículos en crecimiento y regresión (pequeños, medianos y grandes) lo cual contribuiría con un incremento en el NFA ≥ 3 mm y permitiría registrar de este modo un número de folículos similar al observado durante la emergencia de las ondas foliculares, en donde se espera que una población en crecimiento más funcionalmente homogénea (folículos pequeños y medianos) debería estar presente. Esta similitud en el NFA promedio durante estadios distintos del desarrollo folicular ha sido descrita por Gobikrushanth *et al.* (2017) en vacas.

En función a dichos resultados se quiso precisar si el número de folículos emergentes ≥ 3 mm representa una característica consistente dentro de un mismo animal mediante el cálculo de su repetibilidad, es así como se llegó a determinar que el número de folículos antrales ≥ 3 mm durante la emergencia de tres ondas foliculares sucesivas en alpacas posee una repetibilidad de 0.72 ($P < 0.01$) (Anexo 9); cifra que según Harper (1999), y en base a los intervalos de referencia propuestos por Martin y Bateson (1986), permite definir al número de folículos emergentes ≥ 3 mm como una característica con una alta repetibilidad; similar a la reportada por múltiples investigadores en otras especies de mamíferos como los bovinos (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Shahzad *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017) y dromedarios (Manjunatha *et al.*, 2012).

Además, se pudo verificar que dicha repetibilidad (0.72) es mayor que aquella calculada durante periodos desconocidos del crecimiento folicular (días fijos 12 y 24) en los mismos animales en estudio ($r=0.20$)(Anexo 10); siendo esta menor repetibilidad comparable a la reportada en vacas Holstein ($r=0.37$), cuando esta fue calculada en un periodo aleatorio de crecimiento folicular (Gobikrushanth *et al.*, 2017), estas bajas repetibilidades descritas permiten sugerir que los NFA ≥ 3 mm no se correlacionan correctamente al ser evaluados durante estadios desconocidos de la dinámica folicular en alpacas, a pesar de que este NFA pueda ser similar al número observado durante la emergencia folicular como fue descrito en el párrafo anterior. Tomando en cuenta estos antecedentes, podemos inferir que el número de folículos antrales ≥ 3 mm durante la emergencia de las ondas foliculares en alpacas representa una característica altamente repetible ($r=0.72$). Lo cual permite sugerir que el número de folículos emergentes ≥ 3 mm podría representar un carácter de selección en dichos animales, en base a su potencial de crecimiento folicular individual.

Se pudo valorar el grado de la repetibilidad del número de folículos emergentes ≥ 3 mm en alpacas con otras especies, así por ejemplo durante un estudio en vacas de carne se reportó una alta repetibilidad (0.77) entre los números de folículos emergentes (Singh *et al.*, 2004) de dos ondas

foliculares sucesivas de un ciclo estral, siendo similar a la reportada en el presente estudio; pero eso pudo haber sido por el tamaño de los folículos (rango de 2 a 6 mm) y es que en nuestro presente trabajo se contaron todos los folículos ≥ 3 mm de diámetro. Por otra parte, Mossa *et al.* (2012) desarrollaron un estudio sobre la repetibilidad del número folículos en vacas Holstein, en los que ellos observaron una repetibilidad muy alta (0.95) en el número de folículos antrales durante diferentes ondas del ciclo estral; valor que coincidió con lo reportado por Manjunatha *et al.* (2012) en dromedarios ($r=0.95$).

De forma similar, Shahzad *et al.* (2014) fueron quienes reportaron en búfalos una alta repetibilidad (0.85) del número de folículos antrales dentro de un mismo ciclo estral. Estas diferentes repetibilidades en referencia a nuestro estudio pudieron deberse a la diferencia que existe entre el rango de folículos en cada estudio, pues en los dromedarios el rango fue de 8 a 34, en los búfalos fue de 4 a 12 y en vacas Holstein de 1 a 65, pues según explica Senar, (1999) un mayor rango de variación contribuiría positivamente con una mayor repetibilidad. En otro estudio en vacas se intentó evaluar la cantidad total de folículos en desarrollo luego de la ablación folicular cada 7 a 10 días (Boni *et al.*, 1997); pero se logró obtener una moderada repetibilidad (0.58) en el número de folículos que emergieron de forma sucesiva. Ello tuvo una diferencia con nuestro resultado, esto pudo ser porque ellos no realizaron un seguimiento de la dinámica folicular, y se limitaron a eliminar al folículo dominante por ablación induciendo la ovulación y evaluando la respuesta folicular después de cada 7-10 días. Siendo requeridas 24 horas para la observación de una nueva emergencia folicular luego de la ablación según lo descrito por Adams *et al.* (2008). ^a

En búfalos (Shahzad *et al.*, 2014), el número de folículos antrales pudo ser clasificado en bajo (1-4), medio (5-8) y alto (9 o más). En función a ello, en el presente trabajo clasificamos a las alpacas en base al promedio de su número de folículos emergentes en tres categorías que fueron alto (NFA > 3), intermedio ($3 \geq \text{NFA} > 2$) y bajo ($2 \geq \text{NFA}$); la clasificación propuesta fue más ajustada en nuestro estudio, esto fue debido a que hubo un menor rango de folículos antrales (1-8) en comparación con el trabajo de Shahzad *et al.* (2014) en búfalos (rango de 1 a 12). Si embargo se pudo verificar a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que el NFA ≥ 3 mm difiere entre las categorías de clasificación propuestas (Anexo 11). En base a la clasificación realizada, podemos estimar que un 25% de las alpacas presentarían un número de folículos antrales alto (Cuadro 7); lo cual podría representar un criterio de selección valioso en esta especie a través de la ecografía previo al inicio de los protocolos de superovulación; siendo esto similar a lo descrito en vacas por Singh *et al.* (2003).

El intervalo interonda promedio fue de 16.9 ± 3.96 días en alpacas, en donde un número considerable de ondas foliculares tuvo de 14 a 18 días de duración inclusive registrándose ondas foliculares esporádicas con intervalos de 20 y 24 días. Resultados similares a los descritos por Vaughan *et al.* (2004) en donde se observaron un mayor número de intervalos interonda con 12 a 16 días. Sin embargo, estos resultados son distintos a los reportados por Bravo y Sumar (1989) en donde ellos reportan en alpacas intervalos entre dos folículos en dominancia consecutivos de 12 días promedio. Los hallazgos antes mencionados ilustran la amplia variación para esta característica entre alpacas; en donde esta diferencia en el intervalo interonda podría deberse en parte al mayor tamaño que exhiben folículos dominantes alcanzados por los animales en estudio (9 a 13 mm), pues se sabe que el diámetro del folículo dominante se halla directamente correlacionado con el largo del intervalo interonda según lo descrito por Adams *et al.* (1990) y Vaughan *et al.* (2004); y además se podría explicar que la presencia de ondas foliculares con una duración de hasta 24 días se pudo deber al mayor tiempo de retraso que tuvieron algunas ondas foliculares para emerger, como ya anteriormente fue descrito.

En base al registro de datos sobre la duración de las ondas foliculares en las alpacas, se pudo determinar que el intervalo interonda posee una de repetibilidad del 0.23 (Anexo 12), valor que según Harper (1999) permite definir al intervalo interonda como una característica no repetible dentro de un mismo animal; siendo además este valor mucho menor que el reportado por Manjunatha *et al.* (2012) en camellos dromedarios ($r = 0.88$). Lo cual confirma la falta de previsibilidad que tiene la duración de la onda folicular en alpacas.

VI. CONCLUSIONES

- ◆ El número de folículos antrales $\geq 3\text{mm}$ durante la emergencia folicular es distinto entre alpacas adultas ($P < 0.05$).
- ◆ El número de folículos antrales $\geq 3\text{mm}$ durante la emergencia folicular es una característica repetible dentro de un mismo individuo ($r = 0.72$) ($P < 0.01$).
- ◆ El intervalo interonda representa una característica variable y no repetible ($r = 0.23$) en alpacas.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Aba MA, Kindhal H, Forsberg M, Quiroga M, Auza N. 2000.** Levels of progesterone and changes in prostaglandin F₂alpha release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *J Anim Reprod Sci.* 59: 87–97.
2. **Acosta TJ, Miyamoto A. 2004.** Vascular control of ovarian function: Ovulation, corpus luteum formation and regression. *J Anim Reprod Sci.* 83: 127–140.
3. **Adams GP, Griffin PG, Ginther OJ. 1989.** *In situ* morphologic dynamics of ovaries, uterus, and cervix in llamas. *J Biol Reprod.* 41(3): 551–558.
4. **Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1990.** Effects of locational and reproductive status on ovarian follicular waves in llama (*Lama glama*). *J Reprod Fertil.* 90: 535–545.
5. **Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1991.** Form and function of the corpus luteum in llamas. *J Anim Reprod Sci.* 24(1–2): 127–138.
6. **Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. 2005.** Ovulation-Inducing Factor in the Seminal Plasma of Alpacas and Llamas. *J Biol Reprod.* 73(3): 452–457.
7. **Adams GP. 2007.** Ovarian functions in llamas and alpacas. In: Youngquist RS, Threlfall WR, eds. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* 2^a ed. USA: Elsevier. p 873–877.
8. **Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008.** Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *J Theriogenology.* 69(1): 72–80.
9. **Andrade JC. 2007.** Métodos de sincronización de la onda folicular en base a GnRH y LH y su efecto en la respuesta ovárica y tasa de preñez en alpacas y llamas. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 70 p.
10. **Bacha Jr WJ, Bacha LM. 2001.** Atlas color de histología veterinaria. 2a ed. Argentina: Inter-

médica. 304 p.

11. **Bakker J, Baum MJ. 2000.** Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 21(3): 220–262.
12. **Boni R, Roelofsen MW, Pieterse M, Kogut J, Kruij TA. 1997.** Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *J Theriogenology*. 48(2): 277-289.
13. **Bravo PW, Sumar J. 1989.** Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *J Anim Reprod Sci*. 21(3–4): 271–281.
14. **Bravo PW, Fooler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL. 1990.** Ovarian Follicular Dynamics in the Llama. *Biology of Reproduction*. 43(4): 579–585.
15. **Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley BL, Fowler ME. 1991.** The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *J Biol Reprod*. 45(4): 553–559.
16. **Bravo PW, Stabenfeldt GH, Fowler ME, Lasley BL. 1992.** Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotropin-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *J Bio Reprod*. 47(5): 884–8.
17. **Bravo PW, Skidmore J, Zhao X. 2000.** Reproductive aspects and storage of semen camelidae. *J Anim Reprod Sci*. 62: 173–177.
18. **Bravo PW, Huanca W. 2012.** Aspectos técnicos, culturales y científicos de la crianza de llamas y alpacas en sudamérica. En: VI Congreso Mundial de Camelidos Sudamericanos. Chile. p 107–108.
19. **Broer SL, Mol BWJ, Hendriks D, Broekmans FJM. 2009.** The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: Comparison with the antral follicle count. *J Fertil Steril*. 91(3): 705–714.
20. **Brown B. 2000.** Review on reproduction in south american camelids. *J Anim Repro Sci*. 58: 169–195.
21. **Burns D, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight P, Ireland JJ. 2005.** Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *J Bio Reprod*. 73: 54–62.
22. **Bustinza V, Medina G. 1986.** Crecimiento de alpacas. En: V Congreso Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos. Perú. p 23–26.
23. **Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, Jhonson LW. 2014.** Llama and alpaca care:

- Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition and Herd Health. 1^a ed. Canada: Elsevier. 789 p.
24. **Céliz R. 2017.** Determinación de la reserva ovárica en alpacas mediante la concentración de la Hormona Anti Mülleriana (AMH) en el plasma sanguíneo. Tesis de maestría. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 65 p.
 25. **Chaves MG, Aba MA, Agüero A, Egey J, Berestin V, Rutter B. 2002.** Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *J Anim Reprod Sci.* 69(1–2): 37–46.
 26. **Chen BX, Yuen ZX, Pan GW. 1985.** Semen-induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reproduction.* 74(2): 335–339.
 27. **Contreras SI, Díaz T, López G, Caigua A. 2007.** Evaluación de la técnica de ecografía transrectal en la detección de folículos ováricos en ovejas tropicales. En: *Arch Latinoam Prod Anim.* 15: 10–14.
 28. **Correa J, Ratto M, Gatica R. 1997.** Superovulation in llamas with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. *J Anim Reprod Sci.* 46: 289–296.
 29. **Cushman R, Allan M, Kuehn L, Snelling W, Cupp A, Freetly H. 2009.** Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J Anim Sci.* 87: 1971–1980.
 30. **Del Campo M, Del Campo C, Ginther O. 1996.** Vascular provisions for a local utero-ovarian cross-over pathway in new world camelids. *J Theriogenology.* 46: 983–991.
 31. **Driancourt MA. 2001.** Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *J Theriogenology.* 55(6): 1211–39.
 32. **Dufour J, Cahill LP, Mauléon P. 1979.** Short- and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *J Reprod Fertil.* 57(2): 301–9.
 33. **El Allali K, El Bousmaki N, Ainani H, Simonneaux V. 2017.** Effect of the Camelid's Seminal Plasma Ovulation-Inducing Factor/ β -NGF: A Kisspeptin Target Hypothesis. *Frontiers in Veterinary Science* 4(99): 12 p.
 34. **Evans A, Adams GP, Rawlings N. 1994.** Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil.* 100: 187–194.
 35. **Evans ACO. 2003.** Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *J Reprod Dom Anim.* 38(4): 240–246.
 36. **Evans ACO, Mossa F, Fair T, Lonergan P, Butler S, Zielak-Steciwo A, Smith G, Jimenez-Krassel F, Folger J, Ireland JL, et al. 2010.** Causes and consequences of the variation in the

- number of ovarian follicles in cattle. Soc Reprod Fertil Suppl. 67: 421–429.
37. **Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. 2003.** Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. J Hum Reprod. 18(2): 323–327.
 38. **Fernández-Baca S, Novoa C. 1968.** Conducta sexual de la alpaca (*Lama pacos*) en empadre en campo. En: III Reunión ALPA. Perú: Asociación Lationamericana de Producción Animal. 3:7-20.
 39. **Fernandez-Baca S, Madden DH, Novoa C. 1970a.** Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. Journal of reproduction and fertility. 22(2): 261–267.
 40. **Fernandez Baca S, Hansel W, Novoa C. 1970b.** Corpus luteum function in the alpaca. Biology of reproduction. 3(2): 252–261.
 41. **Fernández-Baca S, Novoa C, Sumar J. 1972.** Actividad reproductiva de la alpaca mantenida en separación del macho. En: VII ALPA. Perú: Asociación Lationamericana de Producción Animal. 7: 7–18.
 42. **Fernández-Baca S, Sumar J, Novoa C, Leyva V. 1973.** Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca (*Lama pacos*). En: Rev Inv Pec IVITA Univ San Marcos. 2(2):131–137.
 43. **Fernández-Baca S. 1991.** Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. En: FAO. ONU. Chile. p 1-3.
 44. **Fernández-Baca S. 1993.** Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. J Anim Reprod Sci. 33(1–4): 307–323.
 45. **Ferrer MS, Agüero A, Chaves MG, Russo AF, Rutter B. 2002.** Sincronización de la onda folicular mediante el uso de buserelina en la llama (*Lama glama*). En: Sitio Argentino de Producción Animal. 4(1): 7–11.
 46. **Filipiak Y, Bielli A, Viqueira M. 2016.** Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle. En: Veterinaria. 52(202): p 14-22.
 47. **Fleming R, Seifer D, Frattarelli J, Ruman J. 2015.** Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. J Reprod BioMed. 11 p.
 48. **Fortune JE. 2003.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. J Anim Reprod Sci. 78(3–4): 135–163.
 49. **Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. 2004.** Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. J Anim Reprod Sci. 82–83: 109–126.
 50. **Furman BL. 2017.** Buserelin. En: Reference Module in Biomedical Sciences. p 1–4.

51. **Gigli I, Russo A, Agüero A. 2006.** Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet.* 8(1): 183–204.
52. **Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Martin S, Wiltbank MC. 1996.** Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil.* 108(2): 271–279.
53. **Gobikrushanth M, Dutra P, Bruinje T, Colazo M, Butler S, Ambrose D. 2017.** Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *J Theriogenology.* 92: 90-94.
54. **González-Bulnes A, Moreno JS, García LM, Gomez BA, Lopez SA. 1994.** Observación del ovario en la oveja y eficacia en la detección de folículos y cuerpos lúteos mediante ecografía transrectal. *Invest Agr Prod Sanid Anim.* 9: 319–329.
55. **Gougeon A, Chainy G. 1987.** Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil.* 81: 433–442.
56. **Hafez ESE, Hafez B. 2002.** Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México:McGraw–Hill Interamericana. 519 p.
57. **Hanzen H, Cucho E, Ampuero C, Ordoñez C, Sumar J. 2014.** Principios de la reproducción de los camélidos sudamericanos. 1ª ed. Perú: Fundación universitaria para la investigación, desarrollo, ciencia y cultura. 157 p.
58. **Harper D. 1994.** Some comments on the repeatability of measurements. *J Ring Migrat.* 15:84–90.
59. **Hirshfield AN. 1985.** Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats. *J Biol Reprod.* 32(4): 979–87.
60. **Honaramooz A, Aravindakshan J, Chandolia R, Beard A, Bartlewski P, Pierson R, Rawlings N. 2004.** Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *J Anim Reprod Sci.* 80:15–29.
61. **Huanca T. 2008.** Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de doctorado. España: Univ de Santiago de Compostela. 142 p.
62. **Huanca W, Cardenas O, Olazabal C, Ratto M, Adams GP. 2001.** Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. En: *Revista Invest Vet Peru.* 1:462–463.
63. **Hunter J. 1787.** An experiment to determine the effect of extirpating one ovary upon the number of young produced. En: *Philos Trans R Soc Lond.* 77: 71–80.

64. **Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Smith G, Lonergan P, Evans A. 2007.** Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *J Hum Reprod.* 22(6): 1687–1695.
65. **Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen A, Ward F, Lonergan P, Smith G, Perez G, Evans A, Ireland JJ. 2008.** Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *J Biol Reprod.* 79: 1219–1225.
66. **Ireland JJ, Zielak-Steciwo A, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettegowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight P, Smith G, et al. 2009.** Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *J Biol Reprod.* 80: 954–964.
67. **Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Mossa F, Lonergan P, Evans ACO. 2011.** Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve. *J Reprod Fertil Dev.* 23: 1–14.
68. **Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, Smith GW, Hou X, Davis JS, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ. 2009.** Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. *J Biol Reprod.* 80: 1272–1281.
69. **Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM. 1997.** Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *J Biol Reprod.* 56(2): 303–309.
70. **La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A. 2010.** Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *J Hum Reprod.* 16(2): 113–130.
71. **Leon JB, Smith BB, Timm KI, LeCren G. 1990.** Endocrine changes during pregnancy, parturition and the early post-partum period in the llama (*Lama glama*). *J Reprod Fertil.* 88(2): 503–511.
72. **Leyva V, Sumar J. 1981.** Evaluación del peso corporal al empadre sobre la capacidad reproductiva de hembras alpaca de un año de edad. En: IV Conv Int Camelidos Sudam. Punta Arenas, Chile. p 22-27.
73. **Manjunatha B, Pratap N, Al-Bulushi S, Hago BE. 2012.** Characterization of ovarian

- follicular dynamics in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *J Theriogenology*. 78: 965–973.
74. **Mariana JC, Monniaux D, Driancourt MA, Mauleon P. 1991.** Folliculogenesis. En: Cupps, **Martinez Martin P, Bateson P. 1986.** *Measuring Behaviour: An introductory guide*. 1^a ed. New York: Cambridge University Press. 101 p.
75. **Martinez MF, Adams GP, Kastelic JP, Bergfelt DR, Mapletoft RJ. 2000.** Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *J Theriogenology*. 54(5): 757–769.
76. **Martinez MF, Sanderson N, Quirke LD, Lawrence SB, Juengel JL. 2015.** Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. *J Theriogenology*. 85(3):466–475.
77. **McMillen I, Robinson J. 2005.** Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. En: *Physiol Rev*. 85: 571–633.
78. **Miragaya MH, Aba MA, Capdevielle EF, Ferrer MS, Chaves MG, Rutter B, Agüero A. 2004.** Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*). *J Theriogenology*. 61(4): 663–671.
79. **Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A. 2006.** Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*. 61(2–3): 299–310.
80. **Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget P. 2014.** The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link?. *J Biol Reprod*. 90(4): 1–11.
81. **Mossa F, Leoni G, Berlinguer F, Succu S, Madeddu M, Bebbere D, Naitana S. 2008.** Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances in vitro embryo yield in sheep. *J Anim Reprod Sci*. 109: 134–145.
82. **Mossa F, Jimenez-Krassel F, Folger J, Ireland JLH, Smith G, Lonergan P, Evans A, Ireland JJ. 2010.** Evidence that high variation in antral follicle count during follicular waves is linked to alterations in ovarian androgen production in cattle. *J Reproduction*. 140: 713–720.
83. **Mossa F, Walsh S, Butler S, Berry D, Carter F, Lonergan P, Smith G, Ireland J, Evans A. 2012.** Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dair Sci*. 95(5): 2355–2361.
84. **Nilsson EE, Skinner MK. 2004.** Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *J Molec Cell Endocri*. 214(1–2): 19–25.

85. **Novoa C, Fernández-Baca S, Sumar J, Leyva V. 1972.** Pubertad en la alpaca. En: Rev Inv Vet 1: 29-35.
86. **Pacheco J, Pezo D, Velez V, Bravo PW. 2017.** Descripción ecográfica del inicio de la actividad ovárica en Alpacas (*Vicugna pacos*). En: Rev Investig Altoandin. Puno. 19(2): 195-200.
87. **Palian JW. 2010.** Inducción de ovulación con plasma seminal o análogo de GnRH (acetato de Buselerina) y su efecto sobre la tasa de concepción en alpacas (*Vicugna pacos*), inseminadas con semen fresco. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 66 p
88. **Palma GA. 2008.** Biotecnología de la reproducción. 2ª ed. Argentina: Reprobiootec. 250 p.
89. **Pan G, Chen Z, Liu X, Li D, Xie Q, Ling F, Fang L. 2001.** Isolation y purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the bactrian camel (*Camellus bactrianus*). J Theriogenology. 53:1863–1879.
90. **Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M. 2004.** EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. J Science. 303:682–684.
91. **Parraguez VH, Adams GP, Ratto M, Ragui LA. 2010.** Camelids. In: Willey-Blackwell, editor. Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography. 1º edition. USA. p. 211–223.
92. **Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. 2009.** Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. J Theriogenology. 71(9):1343–1357.
93. **Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. 2012.** Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. Physiological Reviews. 92(3):1235–1316.
94. **Ratto MH, Singh J, Huanca W, Adams GP. 2003.** Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. J Theriogenology. 60(9):1645–1656.
95. **Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. 2005.** Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. J Reprod Biol Endocri. 3:29.
96. **Ratto MH, Cervantes M, Norambuena C, Silva M, Miragaya M, Huanca W. 2011.** Effect of location and stage of development of dominant follicle on ovulation and embryo survival rate in alpacas. J Anim Reprod Sci. 127(1–2):100–105.
97. **Ratto MH, Leduc YA, Valderrama XP, Van Straaten KE, Delbaere LTJ, Pierson RA, Adams GP. 2012.** The nerve of ovulation-inducing factor in semen. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109(37):15042–15047.

98. **Ratto MH, Silva M, Huanca W, Huanca T, Adams GP. 2013.** Induction of superovulation in South American camelids. *J Anim Reprod Sci.* 136: 164–9.
99. **San-Martin M, Copaira M, Zuniga J, Rodreguez R, Bustinza G. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil.* 16(3):395–399.
100. **Sato A, Valencia R, Montoya L. 1986.** Revision anatomica del tracto reproductor de la alpaca hembra. En: *Revista de Camelidos Sudamericanos* n° 2. Perú. p 26-29.
101. **Sato A, Nuñez Q, Valencia RA. 1988.** Estudio anatómico de las arterias del útero de la alpaca (*Lama pacos*). En: *Revista de Camelidos Sudamericanos* n° 6. Perú. p 3-7.
102. **Sato A, Montoya L. 1990.** Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*): Anatomía macroscopica. En: *Revista de camélidos sudamericanos* n° 7. Perú. p 7-13.
103. **Schillo KK. 1992.** Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci.* 70(4):1271–1282.
104. **Schrick FN, Surface RA, Pritchard JY, Dailey RA, Townsend EC, Inskeep EK. 1993.** Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *J Biol Reprod.* 49:1133–1141.
105. **Senger PL. 2005.** Pathways to pregnancy and parturition. 2ª ed. USA: Current Conceptions. 368 p.
106. **Shahzad Q, Riaza R, Akhter T, Sattara A, Nazirb J, Niazi A, Azamc A, Husnac A. 2014.** Repeatability of antral follicular count and its correlation with super stimulation in Nili-Ravi Buffaloes. *J Anim Plant Sci.* 24:765–769.
107. **Shille VM, Lundström KE, Stabenfeldt GH. 1979.** Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *J Biol Reprod.* 21(4):953–963.
108. **Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. 2004.** A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *J Theriogenology.* 62:227–243.
109. **Stevenson JS. 2007.** Clinical reproductive physiology of the cow. In: Youngquist RS, Threlfall WR, eds. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* 2ª ed. USA: Elsevier. p 258–270.
110. **Stewart B. 2013.** Embryo Production by Superovulation and Dual Siring in Alpacas. Tesis de Maestria. USA: The Ohio State University. 51 p.
111. **Sumar J. 1985.** Reproductive physiology in the south american camelids. En: *Instituto Veterinario de Investigación Tropical y de Altura (IVITA).* p 81–95.
112. **Sumar J. 1988.** Removal of the ovaries or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Vet Scand Suppl.* 83: 133–141.

113. **Sumar J. 1994.** Effects of various ovulation induction stimuli in alpacas and llamas. *J Arid Envirom.* 26: 39-45.
114. **Sumar J. 2002.** Llamas y alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales.* 7ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana. p 224–242.
115. **Sumar J, Adams GP. 2007.** Reproductive Anatomy and Life Cycle of the Male and Female Llama and Alpaca. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* 2ª ed. USA: Elsevier. p. 855–865.
116. **Taneja M, Bols P, Van De Velde A, Ju J, Schreiber D, Tripp M, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X. 2000.** Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotrophin stimulation. *J Biol Reprod.* 62: 206–213.
117. **Tibary A, Memon MA. 1999.** Reproduction in the male South American camelidae. *J Cam el Prac Res.* 6(2): 235–248.
118. **Tonhati H, Lôbo RB, Oliveira HN. 1999.** Repeatability and heritability of response to superovulation in holstein cows. *J Theriogenology.* 51(6): 1151–1156.
119. **Vaughan JL, Macmillan KL, D’Occhio MJ. 2004.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *J Anim Reprod Sci.* 80(3–4): 353–361.
120. **Viñoles C, Meikle A, Forsberg M. 2004.** Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *J Anim Reprod Sci.* 80(1–2): 69–79.
121. **Xu YS, Wang HY, Zeng GQ, Jiang GT, Gao YH. 1985.** Hormone concentrations before and after semen-induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reprod Fertil.* 74: 341–346.
122. **Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad S V., Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, et al. 2001.** Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *J Molec Endocri.* 15(6): 854–866.

VIII. APÉNDICE

Anexo 1. Ficha de registro ecográfico individual



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria



OVARIOGRAMA

Registro: Variedad: Identificación:

Color: Peso: CC:

FECHA	OVARIO IZQUIERDO	OVARIO DERECHO	OBSERVACIONES
/ / DÍA: HORA:			

Anexo 2. Número de folículos emergentes ≥ 3 mm por alpaca

		EMERGENCIA	EMERGENCIA	EMERGENCIA
		1	2	3
ALPACA	1	2	2	2
	2	3	3	3
	5	3	3	3
	7	1	1	1
	8	2	3	1
	10	3	3	3
	11	3	2	3
	13	2	2	1
	15	2	2	6
	17	3	3	3
	18	4	1	5
	19	2	2	3
	22	4	4	2
	23	8	6	5
	24	3	3	1
	25	3	2	3
	27	3	2	2
	29	3	1	2
	30	3	1	3
	33	2	2	2
	36	7	4	5
	37	3	3	3
	40	2	2	2
	41	2	3	2
	42	2	1	3
	44	3	2	3
	45	2	2	3
	46	3	2	1
48	5	5	5	
50	2	2	2	
51	5	5	4	
52	3	3	2	
53	3	4	3	
55	1	3	4	

Anexo 3. Prueba de normalidad al número de folículos emergentes ≥ 3 mm

D'Agostino-Pearson

DA-stat	51.02
P-value	0.00
alpha	0.05
Normal	no

Anexo 4. Número de folículos emergentes ≥ 3 mm por alpaca - valores transformados

		EMERGENCIA 1 TRANS	EMERGENCIA 2 TRANS	EMERGENCIA 3 TRANS
ALPACA	1	1,41	1,41	1,41
	2	1,73	1,73	1,73
	5	1,73	1,73	1,73
	7	1,00	1,00	1,00
	8	1,41	1,73	1,00
	10	1,73	1,73	1,73
	11	1,73	1,41	1,73
	13	1,41	1,41	1,00
	15	1,41	1,41	2,45
	17	1,73	1,73	1,73
	18	2,00	1,00	2,24
	19	1,41	1,41	1,73
	22	2,00	2,00	1,41
	23	2,83	2,45	2,24
	24	1,73	1,73	1,00
	25	1,73	1,41	1,73
	27	1,73	1,41	1,41
	29	1,73	1,00	1,41
	30	1,73	1,00	1,73
	33	1,41	1,41	1,41
	36	2,65	2,00	2,24
	37	1,73	1,73	1,73
	40	1,41	1,41	1,41
	41	1,41	1,73	1,41
	42	1,41	1,00	1,73
	44	1,73	1,41	1,73
	45	1,41	1,41	1,73
	46	1,73	1,41	1,00
	48	2,24	2,24	2,24
	50	1,41	1,41	1,41
	51	2,24	2,24	2,00
	52	1,73	1,73	1,41
	53	1,73	2,00	1,73
	55	1,00	1,73	2,00

Anexo 5. Prueba de normalidad al número de folículos emergentes ≥ 3 mm–valores transformados

D'Agostino-Pearson

DA-stat	5,73
P-value	0.06
alpha	0.05
Normal	si

Anexo 6. Distribución del número de folículos antrales 3mm entre emergencias foliculares sucesivas

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRALES \geq 3mm es la misma entre las categorías de EMERGENCIA FOLICULAR .	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	517,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Anexo 7. Distribución del número de folículos antrales \geq 3 mm entre alpacas

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRALES \geq 3 mm es la misma entre las categorías de ALPACA.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	3,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Anexo 8. Evaluación del número de folículos \geq 3mm durante la emergencia folicular y en estadios aleatorios de crecimiento folicular

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de CONTEO DE FOLÍCULOS ANTRALES \geq 3 mm es la misma entre las categorías de ESTADIO DE LA ONDA FOLICULAR.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	127,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Anexo 10. Repetibilidad del número de folículos emergentes ≥ 3 mm

	Correlación intraclase	95% de intervalo de confianza		Prueba F con valor verdadero 0			
		Límite inferior	Límite superior	Valor	gl1	gl2	Sig
Medidas únicas	0.466	0.259	0.659	3.621	33	66	0.000
Medidas promedio	0.724	0.512	0.853	3.621	33	66	0.000

Anexo 9. Repetibilidad del número de folículos ≥ 3 mm durante periodos aleatorios de crecimiento folicular

	Correlación intraclase	95% de intervalo de confianza		Prueba F con valor verdadero 0			
		Límite inferior	Límite superior	Valor	gl1	gl2	Sig
Medidas únicas	0.106	-0.237	0.424	1.236	33	33	0.273
Medidas promedio	0.191	-0.620	0.596	1.236	33	33	0.273

Anexo 11. Distribución del número de folículos según la clasificación de los animales

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRALES ≥ 3 mm es la misma entre las categorías de CLASIFICACIÓN .	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Anexo 12. Repetibilidad del intervalo interonda

	Correlación intraclase	95% de intervalo de confianza		Prueba F con valor verdadero 0			
		Límite inferior	Límite superior	Valor	gl1	gl2	Sig
Medidas únicas	0.132	-0.211	0.446	1.304	33	33	0.225
Medidas promedio	0.233	-0.536	0.617	1.304	33	33	0.225