



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**Respuesta ovárica y calidad embrionaria a la
estimulación con gonadotropina coriónica equina
(eCG) durante fase luteal inducida y fase no luteal en
llamas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médica Veterinaria

AUTOR

Shirley Sujey EVANGELISTA VARGAS

Lima, Perú

2007



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

Evangelista S. Respuesta ovárica y calidad embrionaria a la estimulación con gonadotropina coriónica equina (eCG) durante fase luteal inducida y fase no luteal en llamas [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2007.

ÍNDICE

	pag.
Resumen -----	iii
Abstract -----	iv
Lista de cuadros -----	v
Lista de figuras -----	vi
I. INTRODUCCIÓN -----	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA -----	3
2.1. Aspectos generales -----	3
2.1.1. Conducta reproductiva -----	3
2.2. Fisiología reproductiva de la hembra -----	4
2.2.1. Pubertad -----	4
2.2.2. Foliculogénesis -----	5
2.2.3. Dinámica folicular -----	6
2.2.4. Ovulación -----	8
2.2.4.1. Inducción de la Ovulación Mediante la Cópula -----	9
2.2.4.2. Inducción Hormonal de la Ovulación. -----	10
2.2.4.3. Inducción con Plasma Seminal. -----	10
2.2.5. Luteogénesis y luteólisis -----	11
2.3. Fecundación y desarrollo temprano del embrión -----	13
2.3.1. Fecundación -----	13
2.3.2. Desarrollo embrionario -----	13
2.4. Colección y evaluación de embriones -----	14
2.4.1. Técnica quirúrgica -----	15
2.4.1.1. Laparoscopia -----	15

2.4.1.2. Laparotomía -----	15
2.4.2. Técnica no quirúrgica -----	16
2.4.3. Evaluación de embriones -----	17
2.5. Control del ciclo ovárico -----	18
2.5.1. Sincronización de la onda folicular -----	18
2.5.2. Superestimulación ovárica -----	19
2.5.3. Hormonas utilizadas para la superestimulación ovárica -----	20
2.5.3.1. Hormona folículo estimulante (FSH) -----	20
2.5.3.2. Gonadotropina coriónica equina (eCG) -----	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS -----	22
3.1. Lugar de estudio -----	22
3.2. Animales -----	22
3.3. Procedimiento Experimental -----	22
3.3.1. Tratamientos -----	24
3.3.1.1. T0 (No estimulado) -----	24
3.3.1.2. T1 (Fase No Luteal) -----	24
3.3.1.3. T2 (Fase Luteal) -----	24
3.3.2. Lavado y colección de embriones -----	25
3.3.3. Evaluación de embriones -----	25
3.4. Análisis de Datos -----	26
IV. RESULTADOS -----	27
4.1. Respuesta Ovárica -----	27
4.2. Calidad Embrionaria -----	29
V. DISCUSIÓN -----	31
VI. CONCLUSIONES -----	34
VII. RECOMENDACIONES -----	35
VII. LITERATURA CITADA -----	36

RESUMEN

El efecto del tratamiento superovulatorio durante una fase luteal y fase no luteal sobre la respuesta ovárica y la calidad embrionaria fue estudiado en 45 llamas hembras adultas. Se incluyeron en el estudio aquellos animales que a la ecografía presentaron un folículo preovulatorio ≥ 7 mm. Dichos animales fueron divididos en 3 grupos: T0 (no estimulado), T1 (tratamiento superovulatorio en fase no luteal) y T2 (tratamiento superovulatorio en fase luteal). Los animales de los grupos T1 y T2 recibieron 1ml de LH (día 0) para sincronizar la onda folicular y luego 1000 UI de eCG (día 3) como tratamiento superovulatorio. Para simular la fase luteal en el grupo T2 se utilizaron esponjas vaginales impregnadas con progesterona entre el día 3 al día 7. Posteriormente, se efectuó la inducción de la ovulación mediante monta natural y aplicación de 1 ml de GnRH (día 8). La colección y evaluación de embriones se realizó 7 días post cópula (día 15). En el grupo T0 se realizó monta natural y aplicación de GnRH y 7 días después se realizó la colección de embriones. Se observó que el número de folículos preovulatorios fue mayor en T1 ($11,07 \pm 7,53$) con respecto a T0 ($1,07 \pm 0,26$) y T2 ($6,13 \pm 7,11$). Del mismo modo, el número de cuerpos lúteos fue mayor en T1 ($9,27 \pm 3,37$) con respecto a T0 ($1,07 \pm 0,26$), y T2 ($6,47 \pm 4,29$). Asimismo, el número de embriones fue mayor en T1 ($3,47 \pm 4,26$) con respecto a T0 ($0,33 \pm 0,48$) y T2 ($1,33 \pm 2,53$). Los resultados nos permiten concluir que la aplicación del tratamiento superovulatorio durante una fase no luteal (T1) permiten obtener una mejor respuesta ovárica y embrionaria en comparación con tratamientos superovulatorios aplicados en fase luteal (T2).

Palabras clave: Fase luteal, fase no luteal, tratamiento superovulatorio, embriones, llamas.

ABSTRACT

The effect of superovulatory treatment during luteal and non luteal phase on the ovarian answer and embryo quality was studied in 45 sexually receptive female llamas with a follicle larger than 7 mm observed by ultrasonography. Llamas were allocated to 3 groups: T0 (non stimulated), T1 (superovulatory treatment during non luteal phase), and T2 (superovulatory treatment during induced luteal phase). Animals of groups T1 and T2 received 1m of LH (day 0) for synchronization of follicular wave; and 1000 IU of eCG (day 3) as superovulatory treatment. Simulation of luteal phase on group T2 was realized by using vaginal sponges impregnated with exogenous progesterone during day 3 to day 7. The induction of the ovulation (day 8) was made by natural mount and the application of GnRH (1 ml). Embryo recovery was realized 7 days after natural mount (day 15). Similarly, 7 days after natural mount and application of GnRH, embryo recovery was realized in group T0. It was observed that number of follicles was larger in T1 ($11,07 \pm 7,53$) than T0 ($1,07 \pm 0,26$), and T2 ($6,13 \pm 7,11$). On the same way, number of corpus luteum was larger in T1 ($9,27 \pm 3,37$) than T0 ($1,07 \pm 0,26$), and T2 ($6,47 \pm 4,29$). In addition, number of embryos obtained was larger in T1 ($3,47 \pm 4,26$) than T0 ($0,33 \pm 0,48$), and T2 ($1,33 \pm 2,53$). Results demonstrate that superovulatory treatment during the non luteal phase (T1) has a better response than superovulatory treatment during the luteal phase (T2).

Key words: Luteal phase, non luteal phase, superovulatory treatment, embryos, llamas.

LISTA DE CUADROS

	pag.
Cuadro 1. Grupos y Tratamientos Experimentales.	23
Cuadro 2. Escala de Clasificación Embrionaria de la IETS.	26
Cuadro 3. Folículos Preovulatorios.	27
Cuadro 4. Porcentajes de Ovulación.	28
Cuadro 5. Formación de Cuerpos Lúteos.	28
Cuadro 6. Número de Embriones Colectados.	29
Cuadro 7. Porcentaje de Calidad de Embriones Colectados.	30

LISTA DE FIGURAS

	pag.
Fig. 1. Diseño Experimental.	23

I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos domésticos, llamas y alpacas, son especies de gran importancia económica para el poblador altoandino. La mejora genética mediante la formación de núcleos de reproductores requiere muchos años de trabajo y se encuentra limitada, entre otros factores, la capacidad de la hembra de tener en promedio sólo seis crías en toda su vida reproductiva (Novoa *et al.*, 1999).

El desarrollo y la aplicación de biotecnologías reproductivas como la Ovulación Múltiple y Transferencia de Embriones (MOET) han contribuido al progreso genético en otras especies de interés económico como bovinos y en menor grado en ovinos, caprinos y porcinos. A la fecha, se han desarrollado protocolos de ovulación múltiple para camélidos sudamericanos, más no se han obtenido resultados comparables a los producidos en bovinos, tanto en el número de embriones recuperados como en la calidad embrionaria.

Los camélidos sudamericanos son especies de ovulación inducida con fase folicular continua durante todo el año. Los estudios sobre superovulación en camélidos sudamericanos han sido desarrollados en diferentes fases de desarrollo folicular. Algunos autores han tratado de simular una fase luteal mediante la administración de progesterona exógena (Bourke *et al.*, 1992a; Correa *et al.*, 1994; Bourke *et al.*, 1995; Velásquez y Novoa, 1999), o la inducción de una fase luteal mediante inducción de la ovulación (Bourke *et al.*, 1992a; Bourke *et al.*, 1995; Huanca *et al.*, 1999), mientras que otros autores realizaron el tratamiento superovulatorio durante fase folicular (Bravo *et al.*, 1995; Correa *et al.*, 1997; Velásquez y Novoa, 1999; Novoa *et al.*, 1999).

En estudios previos en camélidos sudamericanos, se ha utilizado hormonas como la eCG y FSH para inducir el crecimiento folicular múltiple. Entre los protocolos hormonales desarrollados para inducir el crecimiento folicular múltiple, se señala la utilización de 1000

ui de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Bourke *et al.*, 1992b, 1995; Correa *et al.*, 1994, 1997; Bravo *et al.*, 1995; Velásquez y Novoa, 1999; Ratto *et al.*, 1999). No obstante el número de cuerpos lúteos obtenido es muy variable (de dos a once por animal) y la tasa de colección embrionaria varía desde 0% (Correa *et al.*, 1994) hasta 50% en el mejor de los casos (Del Campo *et al.*, 1995).

En alpacas, la respuesta ovárica al tratamiento superovulatorio con eCG en fase luteal inducida es mayor que la registrada en fase folicular, tanto en número como en tamaño de los cuerpos lúteos formados (Velásquez y Novoa, 1999). No obstante, en llamas, Bourke *et al.* (1995) señalan que la tasa de recuperación embrionaria es inversamente proporcional al número de cuerpos lúteos.

Una de las limitaciones más importantes para el establecimiento de la técnica de transferencia de embriones en llamas y alpacas, viene a ser la falta de un adecuado protocolo de superestimulación ovárica. Esta limitación ha sido asociada con una baja tasa de respuesta ovárica y la recuperación de embriones de mala calidad. Es por ello que el presente trabajo se realizó con el propósito de estudiar el efecto de la fase luteal (progesterona) sobre la respuesta ovárica y la calidad embrionaria.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS GENERALES

2.1.1. Conducta Reproductiva

Los camélidos sudamericanos (CSA) son especies de ovulación inducida, ya que requieren del estímulo de la cópula para inducir la ovulación y son considerados usualmente como especies de reproducción estacional en su hábitat natural. La temporada normal de apareamiento en este ambiente ocurre en los meses más cálidos y húmedos, cuando el forraje es más abundante.

En la alpaca se ha reportado una temporada reproductiva que va desde diciembre a marzo (Sumar, 1996; Sumar y Adams, 1997). Esta estacionalidad se debe al tipo de manejo, ya que es observada cuando machos y hembras se mantienen juntos durante todo el año; sin embargo, cuando las hembras vacías se mantienen separadas de los machos y se permiten los servicios sólo una vez al mes, tanto machos como hembras muestran receptividad sexual durante todo el año (Fernández-Baca *et al.*, 1972). Esta receptividad se presenta, debido a que en las hembras existe continuidad en el desarrollo folicular ovárico a lo largo de todo el año con presencia de folículos ≥ 6 mm (Bravo, 2002), lo cual mantiene altos los niveles de estradiol, los mismos que actúan en el cerebro produciendo dicho comportamiento (Novoa y Leyva, 1996).

Las llamas no presentan un ciclo estral definido. Cuando se encuentran receptivas muestran una conducta peculiar en presencia del macho; ya sea adoptan una posición prona cuando se les aproxima el macho, se acercan a parejas en cópula y adoptan dicha posición

o se mantienen en la cercanía. Sólo ocasionalmente se observan hembras receptivas montando a otras hembras (Fernández-Baca *et al.*, 1970b).

La conducta de aceptación al macho en llamas, se manifiesta en forma continua por más de 30 días con períodos cortos de 2 días de no aceptación. La aceptación sexual se manifiesta cuando la hembra adopta la posición de cópula inmediatamente frente al macho o después de una corta persecución de 1-2 minutos (Bravo, 2002).

El patrón de apareamiento se distingue en dos fases: una inicial o de cortejo, seguida de la fase final o cópula (Sumar, 1993). Durante la primera fase, el macho persigue e intenta montar a la hembra, prolongándose sólo pocos minutos si la hembra está receptiva. La segunda, en cambio, es de una duración mayor y más variable que puede ser tan prolongada como de 30 a 50 minutos (Bravo *et al.*, 1996).

2.2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA

2.2.1. Pubertad

Smith (1994), señala que la pubertad en llamas hembras se presenta entre los 5 meses y los 2 a 3 años de edad. Sin embargo, la actividad sexual seguida de ovulación y fecundación, ha sido observada en alpacas hembras a partir de los 12 meses de edad, lo cual indicaría el establecimiento de la pubertad (Novoa *et al.*, 1972).

Las tasas de ovulación y fecundación no son diferentes entre hembras (alpacas y llamas), adultas y las de un año de edad (Sumar, 1996). A pesar de esto, las prácticas de manejo generalmente retardan el empadre hasta los 2 años de edad, tanto en hembras alpacas como llamas.

Es durante la pubertad que comienza la maduración folicular, con el inicio de la primera división meiótica del oocito primario y la expulsión del 1^{er} cuerpo polar (Hafez y Hafez, 2002).

2.2.2. Foliculogénesis

Existe una reserva de folículos primordiales, los cuales se forman durante la vida fetal (en la mayoría de mamíferos). El inicio del crecimiento folicular se produce en forma espontánea, totalmente independiente de los estímulos hormonales pasando de un folículo primordial a uno primario que se caracteriza por tener un oocito de mayor tamaño rodeado de células de la granulosa que adquieren forma cúbica. Se desconoce el estímulo que genera que los folículos primordiales vayan entrando en actividad, algunos de estos folículos serán reclutados por los altos niveles de hormona folículo estimulante (FSH) producida por la hipófisis y otros pasaran rápidamente a la atresia (Hafez y Hafez, 2002).

Bajo el estímulo de la FSH los folículos seleccionados forman cierres de unión entre las células de la granulosa y el oocito lo que permite su nutrición. Al mismo tiempo las células de la granulosa se separan del estroma ovárico por medio de la lámina basal. Las células del estroma que rodea al folículo se convierten en capas de células concéntricas, que adquiere además capacidad de síntesis de hormonas las cuales adquieren el nombre de células de la teca (Cunningham, 2003).

Es en la etapa pre-antral que el oocito va aumentando su tamaño y se rodea de la zona pelúcida. Se puede apreciar también una proliferación de las células granulosa. En esta etapa el crecimiento celular es dependiente de FSH y se correlaciona con un incremento en los niveles de estrógeno en el plasma (Hafez y Hafez, 2002).

Las células de la granulosa tienen la capacidad de sintetizar tres tipos de hormonas, estrógenos, progestágenos y andrógenos. Los estrógenos se producen a través de la aromatización de los andrógenos por intermedio de la aromatasa, la cual es inducida por la FSH, al mismo tiempo la FSH va a estimular el crecimiento de las células de la granulosa. A medida que estas células van produciendo más estrógenos, estos inducen, la expresión de un mayor número de receptores para FSH dentro del folículo (Cunningham, 2003).

Durante la etapa antral, el folículo produce gran cantidad de líquido (bajo el estímulo de los estrógenos y la FSH) que se acumula en el centro formando un antro, el cual presenta niveles altísimos de estrógeno y por ende un mayor número de receptores

para FSH. Este medio interno estimula la proliferación de las células de la granulosa (Hafez y Hafez, 2002).

El incremento de los niveles plasmáticos de estrógeno tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la producción de FSH. Además, las células de la granulosa producen inhibina bajo el estímulo de la FSH, la cual frena la producción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en la hipófisis. Esto determina que sólo aquel folículo que adquiere un mayor número de receptores de FSH, autoinducidos por sus propios estrógenos, podrá tolerar el descenso de la estimulación. En los otros folículos la baja de la FSH determina una disminución de la actividad de la aromatasa lo que conlleva un aumento de los de andrógenos intrafoliculares, provocando finalmente su atrofia. La granulosa no posee receptores de LH, dichos receptores se encuentran en la teca interna; sin embargo, la FSH cumple también la función de preparar a las células de la granulosa para la fase lútea induciendo la formación de receptores para LH en las últimas fases de la maduración folicular (Cunningham, 2003).

El rol principal de la LH es la inducción de la ovulación, seguidamente a la ovulación se produce la luteinización de las células del folículo ovulatorio y comienza la secreción de progesterona (Hafez y Hafez, 2002).

2.2.3. Dinámica folicular

Estudios en alpacas por laparoscopia (Bravo y Sumar, 1989) y en llamas por ultrasonografía (Bravo *et al.*, 1990) demostraron que la dinámica folicular en estas especies se desarrolla en ondas foliculares. La onda folicular consiste en un grupo de folículos antrales reclutados por un pico de FSH, en donde los folículos de 3 mm (los primeros en ser observados) tienen un crecimiento similar, hasta el momento en que generalmente uno se vuelve dominante y continúa creciendo, mientras que los demás sufren atresia (Hafez y Hafez, 2002). Los folículos se vuelven dominantes cuando miden más de 6 mm de diámetro, folículos más grandes a este diámetro son los responsables de la receptividad continua al macho en cualquier momento durante la onda anovulatoria (Aba *et al.*, 1995).

Se ha apreciado que en ausencia del macho, la actividad ovárica ocurre en ondas de crecimiento y regresión folicular. En cada onda folicular, un folículo se hace dominante,

crece para madurar y finalmente regresiona. (Bravo *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1990). Bravo y Sumar (1989) observaron que el intervalo entre ondas foliculares es de 15 días. Similar resultado ha sido reportado recientemente por Vaughan *et al.* (2004) quien observó que 39 % y 32 % de las alpacas del estudio presentaron intervalos entre ondas de 12 y 16 días, respectivamente.

Bravo *et al.* (1990) en un estudio con llamas obtuvieron un promedio de duración de $4,8 \pm 1,5$ días para el folículo en crecimiento (3 – 8 mm), $5,0 \pm 1,6$ días para la fase de madurez folicular (folículos de 8 - 12 mm) y $4,0 \pm 1,1$ días en la fase de regresión folicular (hasta llegar a medir 3 mm nuevamente), abarcando en total 14 días aproximadamente para el desarrollo de una onda folicular. En dicho estudio se concluyó que el folículo dominante presentaba un tiempo de vida de entre 12 a 14 días, el intervalo entre ondas duraba un lapso de aproximadamente 11,1 días en llamas, y que la ocurrencia de sucesivos folículos dominantes tendió a alternar entre los ovarios en un 85 % de las ondas foliculares.

También existe información sobre la actividad folicular durante tres diferentes condiciones fisiológicas en llamas: anovulatorias (sin apareamiento), ovulatorias no preñadas (apareamiento con macho vasectomizado) y ovulatorias preñadas. En llamas ovulatorias no preñadas, el folículo dominante de la primera onda anovulatoria es detectado 3 días después de la ovulación, así mismo, los folículos dominantes de dicha onda pueden medir entre 9 a 15 mm de diámetro en el día 15. Además, el tiempo de vida de los folículos dominantes anovulatorios es de 20 a 25 días y el intervalo entre ondas es de $19,8 \pm 0,7$ días, tanto en llamas ovulatorias no preñadas como en las anovulatorias (Adams *et al.*, 1990).

En estudios posteriores, se observó que el diámetro máximo del folículo dominante anovulatorio fue mayor en llamas no preñadas ($12,1 \pm 0,4$ mm en llamas anovulatorias y $11,5 \pm 0,2$ m.m ovulatorias) que en llamas preñadas ($9,7 \pm 0,2$ mm) (Adams, 2001), y que el tiempo de vida del folículo dominante es de $22,6 \pm 2,5$ días con un intervalo entre ondas es de $18,0 \pm 2,6$ días (Chaves *et al.*, 2002) en llamas no preñadas.

La observación de folículos dominantes de menor diámetro ($10,4 \pm 0,2$ mm) se encuentra asociada con la presencia de cuerpo lúteo y con la etapa de lactación, ya que en llamas ovulatorias preñadas el intervalo entre ondas es de $14,8 \pm 0,6$ días y durante la

lactación se observa un intervalo entre ondas de $2,5 \pm 0,5$ días. Además, existe disminución del diámetro del folículo dominante de la primera onda anovulatoria, debido a los altos niveles de progesterona secretada por el cuerpo lúteo resultante de la cópula con un macho vasectomizado. Es por esta razón que la lactación y la presencia de un cuerpo lúteo están asociadas a la depresión del desarrollo folicular (Adams *et al.*, 1990).

Santiani *et al.* (2002), demostraron que la progesterona exógena inhibe el desarrollo de los folículos dominantes y subordinados durante los días de tratamiento, y que luego de finalizado aumenta el número de folículos subordinados, probablemente debido a la regresión del folículo dominante que permite la emergencia de una nueva onda folicular.

Una prolongada exposición a progesterona como la observada en llamas gestantes, resulta en una significativa reducción en el diámetro de la segunda onda anovulatoria y una temprana regresión del folículo dominante en la primera onda, resultando en un intervalo entre ondas más corto que el observado en hembras anovulatorias (no apareadas) y ovulatorias no preñadas (apareamiento estéril) (Adams *et al.*, 1990).

2.2.4. Ovulación

Los folículos preovulatorios experimentan tres cambios principales durante el proceso ovulatorio: Maduración citoplasmática y nuclear, la pérdida de la cohesividad de las células del montículo ovárico (entre las células de la capa granulosa) y el adelgazamiento y rotura de la pared folicular externa (Hafez y Hafez, 2002).

En las hembras domésticas la oogénesis se completa en el momento de la ovulación, ya que hasta este momento los oocitos permanecen detenidos en la primera división meiótica, pero aptos para madurar y diferenciarse hasta metafase II y ser posteriormente fecundados (Hafez y Hafez, 2002).

En las especies de ovulación inducida, la liberación preovulatoria de GnRH es iniciada por la introducción del órgano copulador del macho durante el empadre, dicho estímulo provoca señales de las neuronas somatosensoriales, las cuales generan la activación de las neuronas noradrenérgicas. Estas neuronas noradrenérgicas estimulan al hipotálamo basal medio y cuando éste está activado promueven la liberación de GnRH

desde terminales nerviosos en la eminencia media. Dicha GnRH es conducida a través del sistema hipotálamo-hipofisario hasta la hipófisis anterior, donde estimula la liberación de las gonadotropinas: LH y FSH, las cuales regulan la esteroidogénesis y la maduración de gametos (Hafez y Hafez, 2002).

2.2.4.1. Inducción de la Ovulación Mediante la Cópula

Al pertenecer los CSA al grupo de los ovuladores inducidos, los folículos no se rompen a menos que sean estimulados por factores apropiados (Novoa, 1991), dicho estímulo es la copulación (San-Martín *et al.*, 1968). Posterior a dicho estímulo se realiza la liberación preovulatoria de GnRH y el resultante surgimiento del pico preovulatorio de LH (Novoa y Leyva, 1996).

La ovulación en camélidos sudamericanos ocurre a 24 horas o más post-cópula (San-Martín *et al.*, 1968). Habiéndose determinado mediante la técnica de ultrasonografía que el tiempo de ovulación para llamas de $30,13 \pm 1,30$ horas post-cópula (Huanca *et al.*, 2001).

El servicio con introducción del pene de machos vasectomizados o enteros, elevó significativamente la tasa de ovulación en 77 % y 82 %, respectivamente. Este 20 - 30 % de hembras que no llegaron a ovular podría estar relacionado a la falta de descarga ovulatoria de LH en respuesta a la cópula, esto demostraría que el estímulo efectivo para la ovulación es la introducción del pene (Fernández-Baca, 1993). En cambio alpacas montadas por otras hembras y por macho llevando delantal (para prevenir la introducción del pene) presentaron una baja respuesta ovulatoria (15 %) (Sumar, 1993).

Cuando se incrementó a tres el número de servicios en un período de 24 horas, no se afectó el rango de ovulación (Fernández-Baca, 1993). De la misma forma no se detectó una segunda liberación de LH, después de una segunda cópula 24 horas después de la primera (Bravo, 1997).

En camélidos, es la estimulación producida por la cópula y no el incremento de estrógenos, la que inicia el proceso de descarga de LH (Novoa y Leyva, 1996). Es así que las concentraciones de estradiol no variaron durante las 18 horas post-cópula, 22 horas

después estas tienden a declinar y son significativamente menores alrededor de 48 horas post-cópula (Bravo, 1997). Mientras la LH estuvo elevada en llamas ($2,6 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$) inmediatamente después de la cópula (Aba *et al.*, 1995); al igual que las concentraciones de prostaglandina en llamas ($709 \pm 60 \text{ pmol /L}$) y alpacas (30 pmol /L).

Se ha reportado una incidencia de 3.5 a 10 % o más de ovulaciones espontáneas en llamas y alpacas (Fernández-Baca *et al.*, 1970b) esto probablemente está influenciado a estímulos visuales, olfatorios y auditivos (Sumar *et al.*, 1987). Por el contrario la frecuencia de fallas a la ovulación se da en un 10 a 30 % (Bravo *et al.*, 1991), y las ovulaciones múltiples suceden en un 10 % de animales (Fernández-Baca *et al.*, 1970b).

2.2.4.2. Inducción Hormonal de la Ovulación

Las hembras camélidas pueden ovular sin estímulo coital mediante la administración de hormonas (Fernández-Baca, 1993). La aplicación de 750 ui de hCG fue suficiente para inducir ovulación en 100 % de alpacas y 80 - 800 μg de GnRH provocaron la ovulación en 80 % de llamas y alpacas (Bravo *et al.*, 1990). Similar respuesta se ha observado con la aplicación de 1 mg de LH i.m. (Sumar, 1993).

Huanca *et al.* (2001) determinaron que el tiempo de ovulación en llamas es de $30,2 \pm 1,6$ horas después de la aplicación de 1 ml de GnRH y de $30,2 \pm 2,3$ horas posterior a la aplicación de 0,5 ml de LH. La aplicación de LH (300 ui) o de la asociación de hCG (100 – 200 ui) con GnRH por vía intravenosa produce ovulación en camellos bactrianos (Zhao *et al.*, 1990).

2.2.4.3. Inducción con Plasma Seminal

Estudios realizados en camellos bactrianos señalan que la aplicación i.m. de semen o fluido seminal provoca ovulación (Zhao *et al.*, 1990).

Se han realizado estudios en llamas y alpacas para determinar la respuesta ovulatoria ante la aplicación de plasma seminal. Se ha determinado que la aplicación vía i.m. de plasma seminal de llama, alpaca y en menor grado el plasma seminal de toro inducen ovulación en llamas (López, 2004). Lo cual fue corroborado por Adams *et al.* (2005) quienes determinaron que el plasma seminal de alpaca y de llama produce un

aumento en los niveles de LH circulante y la consiguiente ovulación junto con la respuesta lúteogénica.

Un estudio reciente señala que la fracción de plasma seminal capaz de inducir ovulación en llamas, fue aquella que tuvo un peso molecular mayor de 30 Kda; registrándose un 100 % de ovulaciones en las hembras tratadas con esta fracción (Vásquez, 2005).

2.2.5. Lúteogénesis y luteólisis

Después de la ovulación comienza la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa. Posteriormente el tejido del cuerpo lúteo se agrandan principalmente por hipertrofia de las células luteínicas (Hafez y Hafez, 2002).

El cuerpo lúteo se puede detectar mediante ultrasonografía alrededor del día 3 - 4 post-cópula en alpacas, y a los 4 - 5 días post-cópula en llamas (Fernández-Baca *et al.*, 1970a; Adams *et al.*, 1991)

El cuerpo lúteo alcanza un diámetro máximo de entre 12 – 14 m.m al día 8 - 9 post-cópula en animales no preñados, después de dicho tiempo ocurre un declive marcado en el tamaño del mismo (Adams *et al.*, 1991).

Sin embargo, Bourke *et al.* (1992a) hallaron un diámetro máximo de 12 mm para llamas no preñadas y de 14 mm para llamas preñadas después de 7 ó 16 días respectivamente. Y un tiempo de vida de cuerpo lúteo, de aproximadamente 11 días en las no preñadas.

Bravo (1997) sugiere la existencia de una relación directamente proporcional entre el peso del cuerpo lúteo, el diámetro de éste, y las concentraciones sistémicas de progesterona. Sumar *et al.* (1987) encontró concentraciones sanguíneas de progesterona de entre 10 a 20 nmol/L.

Tanto en llamas preñadas como no preñadas, el inicio del incremento de la concentración plasmática de progesterona se da el día 4 post ovulación, hallándose el nivel

máximo el día 6 post ovulación. El nivel promedio de progesterona plasmática en llamas preñadas fue de 3 ng/ml. El día 8 post ovulación se observó una disminución del nivel de progesterona plasmática (< 1 ng/ml) en llamas no preñadas (Adams *et al.*, 1991).

Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual la Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ejerce su acción, se presume que tiene acción de agente lúteolítico en camélidos, ya que se encontró que la prostaglandina exógena afecta la vida del cuerpo lúteo al ser administrada después del día 4 de la fase luteal inducida (Leyva y García, 1999b). También se halló que la progesterona exógena administrada tempranamente reduce la vida del cuerpo lúteo, pero este efecto disminuye conforme se incrementa la edad del cuerpo lúteo (Leyva y García, 1999a).

Entre los días 9 y 12 los niveles de PGF_{2α} empezaron a elevarse hasta 805 ± 131 pmol/L (Aba *et al.*, 1995), lo cual se debe al efecto lúteolítico de la PGF_{2α}, liberada desde el útero.

En alpacas, la receptividad al macho desaparece cinco días post ovulación, si no se produce la fecundación. El cuerpo lúteo involuciona a partir del día 13 post ovulación, y es debido a este evento que retorna la receptividad al macho (Fernández-Baca, 1971). Leyva y García (1999a) sugieren que la receptividad que se observa en los primeros días posteriores a la ovulación, son debidos a que los niveles de progesterona secretados por el cuerpo lúteo son todavía insuficientes para ejercer el efecto inhibitorio sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

En el caso de llamas preñadas existe un descenso en los niveles séricos de progesterona entre los días 8 – 10 post-cópula (Adams *et al.*, 1991), esta caída momentánea representaría el inicio de la regresión luteal inducida por el útero, pero rescatado por el embrión en desarrollo; quien produciría una señal para su reconocimiento maternal (Aba *et al.*, 1995). La presencia de un cuerpo lúteo funcional secretando progesterona, inhibe la presentación de celo en las hembras preñadas (Novoa y Leyva, 1996).

2.3. FECUNDACIÓN Y DESARROLLO TEMPRANO DEL EMBRIÓN

2.3.1. Fecundación

La fecundación se da lugar en el ampulla del oviducto, es aquí que se almacenan los espermatozoides (Hafez y Hafez, 2002). La fecundación se inicia cuando el espermatozoide pasa a través del *cumulus oophorus* del ovocito, se produce la fijación del espermatozoide a la membrana plasmática y ocurre la penetración (entre 5 a 15 minutos después de la fijación) (Cunningham, 2003).

Para la fijación es esencial que el gameto masculino tenga el acrosoma intacto. La reacción acrosómica permite la liberación de acrosina y hialurodinasa, por medio de la cual los espermatozoides digieren una parte de la zona pelúcida para abrirse paso hacia la membrana vitelina. La hialuronidasa y otras enzimas presentes en el acrosoma de los espermatozoides, permiten la penetración del montículo celular (Hafez y Hafez, 2002).

Una vez que el espermatozoide penetra se produce la activación del ovocito, y por lo tanto la reanudación de la meiosis, la cual finalizará con la formación del segundo corpúsculo polar y el pronúcleo femenino. También se produce la formación del pronúcleo masculino (Cunningham, 2003).

Ya formados ambos pronúcleos, estos comienzan a migrar hasta encontrarse y producirse la aposición central de los mismos. Poco después se condensa la cromatina, se disuelven las membranas pronucleares y ambos grupos de cromosomas se pueden distinguir en profase. Finalmente la mitosis continúa, produciéndose en la metafase la mezcla de los cromosomas, este es el momento final de la fecundación y el principio del desarrollo embrionario (Cunningham, 2003).

2.3.2. Desarrollo embrionario

Poco después de la fecundación el cigoto comienza a dividirse aproximadamente una vez al día (esto difiere según la especie), a la vez que va recorriendo el oviducto hacia el útero, esto último facilitado por la acción de los estrógenos. En este proceso, la división se produce sin que aumente la masa celular. En la mayoría de las especies el embrión llega

al útero de 3 a 5 días después de la fecundación, normalmente en la etapa de 16 células o blastómeros (Cunningham, 2003).

La mórula (16 – 32 células), se nutre de las secreciones uterinas y de las propias reservas del vitelo, mientras que en las etapas anteriores el embrión se nutría de las secreciones oviductales (Cunningham, 2003).

Las divisiones se continúan y comienza la producción de líquido para la formación del blastocele. Esta etapa, en la que el embrión aún se encuentra rodeado por la zona pelúcida, recibe el nombre de blastocisto (Cunningham, 2003).

Entre 4 a 8 días post ovulación se produce la rotura de la zona pelúcida y la salida del embrión por el punto de rotura, esta fase es conocida como blastocisto eclosionado, es ahí cuando comienza una fase de alargamiento y rápido crecimiento, pasando de una forma esférica a una tubular. El momento en el que ocurre es variable según la especie y coincide con la migración uterina (Cunningham, 2003).

Se ha determinado que el desarrollo embrionario en camélidos, sin influencia de hormonas exógenas es el siguiente: a los 3 días post-cópula el embrión se encuentra en fase de 4 - 8 células, al día 4 en fase de 8 - 16 células, al día 5 en fase de mórula, al día 6 y 7 en fase de blastocisto, al día 8, 9 y 10 en fase de blastocisto expandido (Bravo *et al.*, 2004)

También se ha observado un crecimiento acelerado y variabilidad de los embriones de hembras con tratamiento superovulatorio con eCG en comparación con hembras que no fueron estimuladas. Ya que durante la colección, los embriones se encontraban en fase de blastocisto (sin tratamiento) y blastocisto expandido (con tratamiento con eCG) en los días 6 - 7 post-cópula (Bravo *et al.*, 2004).

2.4. COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE EMBRIONES

Existen dos técnicas de colección de embriones: la quirúrgica y la no quirúrgica. La colección embrionaria en ovinos se efectúa generalmente entre 3 - 7 días después del celo. El lavado temprano de los oviductos se realiza entre los días 3 - 4 y el lavado del cuerno

uterino entre los días 5 - 7. Los embriones colectados varían su desarrollo desde embrión de 8 -16 células a blastocistos (Kmaid *et al.*, 2003).

En CSA los embriones son recuperados alrededor del día 6 - 7 pos-cópula en estadio de blastocisto o blastocisto expandido (Bravo *et al.*, 2004).

2.4.1. Técnica Quirúrgica

La técnica quirúrgica (laparoscopia o laparotomía) es generalmente utilizada en la colección de embriones en rumiantes menores (Kmaid *et al.*, 2003).

2.4.1.1. Laparoscopia

Durante la laparoscopia se realiza tres pequeñas punciones en el área anterior a la ubre, luego de corroborar la posición correcta del laparoscopio, la cavidad abdominal es insuflada con dióxido de carbono para inducir un neumoperitoneo. Seguidamente se procede a localizar los ovarios (para el conteo de cuerpos lúteos) y el útero (Kmaid *et al.*, 2003)

El cuerno uterino a ser lavado es fijado por la base, luego se punza con un trócar. Un catéter flexible es introducido dentro de la luz uterina, es dirigido hacia la punta del cuerno y posteriormente el balón de dicho catéter es inflado bajo control visual. El lavado debe realizarse sellando la punta del cuerno para evitar la pérdida de medio por el oviducto. El medio de lavado es recuperado por la misma vía por la que se introduce y es recuperado en un placa Petri. Se utilizan 30 ml de medio de lavado, repitiendo la operación al menos 2 veces por cada cuerno (Kmaid *et al.*, 2003).

2.4.1.2. Laparotomía

La primera colección de embriones de alpaca fue realizada por medio de la laparotomía de los oviductos, durante este estudio se recuperaron embriones 3 días post-cópula en estadio de mórula (Novoa y Sumar, 1968).

Luego de realizados los procedimientos de asepsia y anestesia propios de una cirugía, se procede a ubicar al animal en una camilla que permita su elevación en un ángulo de 60 grados, para conseguir que las vísceras se desplacen en forma craneal. Seguidamente se realiza una incisión ya sea medial o paramedial. Los planos musculares son divididos hasta lograr el ingreso a la cavidad abdominal. Una vez localizados los ovarios y útero, son sujetados mediante el uso de compresas de gasa. Posteriormente se procede a efectuar un pequeño ojal en la base del cuerno, y a través del mismo se introduce el catéter foley para el lavado. Una vez introducido el catéter en el lugar deseado, el balón es inflado hasta que se sienta (por palpación) que obstruye el lumen uterino. Posteriormente se procede al lavado (Kmaid *et al.*, 2003)

2.4.2. Técnica No Quirúrgica

Para la colección de embriones por medio del método no quirúrgico la donante es anestesiada con una inyección epidural para prevenir el movimiento de la misma durante la colecta. La zona vulvar es desinfectada para evitar la contaminación (Del Campo *et al.*, 1995).

Se emplea una sonda Foley de una vía. La misma mide 29 cm de largo, el extremo entre el globo y la punta mide 3 cm, y presenta dos orificios en la punta. El catéter es provisto de un mandril para aumentar su rigidez y facilitar la manipulación, dicho catéter es suavemente introducido a través del cérvix y conducido hacia los cuernos uterinos. El balón es palpado a través del recto e inflado hasta que se sienta que obstruye el lumen uterino. Para esta maniobra es recomendable dar pequeños tirones al catéter para comprobar que no se deslice. Si el balón es inflado rápidamente o sobreinflado puede dañarse el endometrio, e incluso el miometrio provocando hemorragias (Kmaid *et al.*, 2003).

El fluido ingresa al útero por los orificios de la punta del catéter. Una vez que el fluido está en el útero, el cuerno es suavemente masajead y el fluido (conteniendo al embrión) es recuperado a través del catéter ya sea por aspiración o por gravedad. Este proceso es repetido luego en el otro cuerno (Del Campo *et al.*, 1995; Bourke *et al.*, 1992b).

2.4.3. Evaluación de embriones

Al momento de evaluar los embriones colectados se debe tener en cuenta que los estadios de desarrollo y la morfología afectan en gran manera la implantación y sobrevivencia de los mismos. La calidad embrionaria es usualmente clasificada en 4 grados, aunque algunos investigadores los clasifican en 2 ó 5 grados (Kanagawa *et al.*, 1995).

Los criterios de clasificación son aplicables a embriones capaces de sobrevivir, excluyendo a los inmaduros o deformes; sin embargo, los grados de calidad son muy subjetivos y dependientes del técnico. Algunas veces embriones pobres muestran una tasa de sobrevivencia mayor a la de óvulos excelentes (Kanagawa *et al.*, 1995).

Durante la clasificación, se evalúa al embrión en sí (forma y tamaño), la zona pelúcida (espesor y daño), las células del embrión (forma, tamaño y color), la granulación de la superficie de la célula, el porcentaje de células deformes, el citoplasma (granulado o nulo), la presencia de células del macizo celular (separadas o no), etc. (Kanagawa *et al.*, 1995).

Son clasificados como intransferibles los ovocitos infértiles, embriones deformes o zonas pelúcidas sin presencia de células trofoblásticas (Kanagawa *et al.*, 1995).

El tamaño de los embriones de llamas y alpacas superovuladas varían desde 0.1 mm a 1 mm, estos son usualmente colectados 6 - 7 días post-cópula en fase de blastocisto expandido (Del Campo *et al.*, 2002).

Del Campo *et al.* (2002), colectaron un total de ciento sesenta y tres embriones de llama y diecinueve embriones de alpaca, la media del diámetro de los embriones fue de $0,527 \pm 0,168$ mm y $0,534 \pm 0,151$ mm respectivamente. Cerca del 35 % de los embriones recuperados fueron pequeños ($\leq 0,45$ mm de diámetro), el 40 % fueron medianos (0,451 – 0,650 mm) y el 24 % fueron grandes ($\geq 0,651$ mm). Estas variaciones en el diámetro de los embriones, se encontraron relacionadas al tipo de ovulación, siendo de mayor diámetro aquellos procedentes de ovulaciones únicas y menores los de ovulaciones múltiples

Al parecer los embriones de alpaca y llama se desarrollan rápidamente en comparación con otras especies. Ya que al día 3 después de la inseminación, se han logrado recuperar (del oviducto) embriones de llama en el estadio de mórula (Bourke *et al.*, 1992b)

2.5. CONTROL DEL CICLO OVÁRICO.

2.5.1. Sincronización de Onda Folicular

Se entiende por sincronización de onda folicular a las técnicas aplicadas para conseguir que un grupo de animales hembras presente conducta de receptividad sexual en un determinado período de tiempo. La sincronización se puede llevar a cabo por medio de diversos protocolos. Actualmente existen protocolos comprobados y eficientes de sincronización para especies de ovulación espontánea como son los bovinos, ovino, caprinos, etc. (Menchaca *et al.*, 2003).

Dentro de las hormonas utilizadas se encuentran la progesterona, $\text{PGF}_{2\alpha}$, GnRH, estradiol y gonadotropina coriónica humana (hCG) (Menchaca *et al.*, 2003). Estudios en ovinos con el uso de progestágenos exógenos señalan que la colocación de un dispositivo intravaginal (CIDR) conteniendo progesterona más la aplicación de 17β estradiol vía i.m. el día 0 del ciclo estral, con el posterior retiro del CIDR y la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ vía i.m. el día 7 y la aplicación de 17β estradiol vía i.m. el día 8 producen la sincronización de la onda folicular en dicha especie (Menchaca *et al.*, 2003).

Como otra alternativa para la sincronización de onda folicular en ovinos se señala la aplicación de GnRH i.m. el día 0 del ciclo estral, 7 días después se realiza la aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$, y el día 9 nuevamente se realiza la aplicación de GnRH. La aplicación de ambas hormonas es realizada a la misma hora (Menchaca *et al.*, 2003). También se puede utilizar $\text{PGF}_{2\alpha}$, en forma exclusiva, la cual se aplica en forma i.m. el día 0 del ciclo estral y se realiza la segunda aplicación de $\text{PGF}_{2\alpha}$, el día 14 (Menchaca *et al.*, 2003).

En un trabajo reciente se ha demostrado que por medio de la aplicación de LH, la ablación folicular y la aplicación de la combinación progesterona-estrógenos, se logra la sincronización de la onda folicular, obteniendo un crecimiento uniforme de los folículos de la nueva onda (Ratto *et al.*, 2003). En dicho estudio se observó por ultrasonografía que a los 2 días post-aplicación de LH se inició la emergencia de una nueva onda folicular y que a los 20 días post-aplicación de LH los folículos de la nueva onda alcanzan ≥ 8 mm (Ratto *et al.*, 2003).

2.5.2. Superestimulación Ovárica

La superestimulación ovárica consiste en la inducción del crecimiento, maduración y ovulación de un gran número de folículos simultáneamente. Para obtener una respuesta superestimuladora es necesario que el inicio del tratamiento hormonal se realice en ausencia de folículos ≥ 7 mm. (Miragaya *et al.*, 2005).

Una limitante para el desarrollo de los programas de superestimulación ovárica y transferencia de embriones ha sido la gran variabilidad observada en la respuesta ovárica luego de los tratamientos superovulatorios, si bien dicha variación responde a un componente multifactorial (raza, edad, condición corporal, estado fisiológico, hormonas utilizadas), se ha demostrado en ovinos que el estatus folicular ovárico juega un rol decisivo. Es decir, los mecanismos que determinan el patrón de desarrollo folicular en ondas de crecimiento y regresión están estrechamente vinculados con la respuesta a los tratamientos (Vivanco *et al.*, 1994).

La superestimulación ovárica puede ser inducida por medio de diferentes hormonas y sustancias administradas. El uso de estas hormonas y su combinación permite el control de los mecanismos endocrinos que determinan el desarrollo folicular y la ovulación. En llamas y alpacas han sido usadas tanto la eCG como la pFSH (hormona folículo estimulante porcina) en distintos protocolos de superovulación, tanto en fase luteal como en fase de receptividad sexual (fase folicular) (Ratto *et al.*, 1997; Velásquez y Novoa, 1999; Novoa *et al.*, 1999; Ratto *et al.*, 1999).

Bourke *et al.* (1995) realizó el tratamiento superovulatorio en fase luteal, dicho protocolo consistió en la aplicación de GnRH ó hCG cuando los folículos presentaban un

tamaño ≥ 9 mm (día 0). Al día 7 se realizó la administración de 1000 ui de eCG i.m. Al día 9, se aplicó una dosis de PGF_{2 α} como lúteolítico y 750 ui de hCG para inducir ovulación.

También se han desarrollado protocolos de superestimulación ovárica en presencia de una fase luteal simulada por tratamiento con progesterona, mediante la aplicación de un CIDR norgestomat o la administración de progesterona por 7 a 12 días. Como tratamiento superestimulador se realizó la aplicación de 20 mg de FSH durante 5 días cada 12 horas (dosis total de 200 mg) ó 1000 ui de eCG 48 horas antes de la remoción de la progesterona. Y finalmente se administró 750 ui de hCG ó 8 μ g de GnRH como inductor de ovulación (Bourke *et al.*, 1992b; Bourke *et al.*, 1995; Correa *et al.*, 1994).

Correa *et al.* (1997) y Ratto *et al.* (1997) realizaron protocolos de superestimulación ovárica en presencia de receptividad sexual. Los animales que presentaron receptividad continua por 5 días, recibieron 20 mg de FSH durante 5 días cada 12 horas (dosis total de 200 mg) como tratamiento superestimulador y 750 ui de hCG como inductor de ovulación.

Existe variación en el número de ovulaciones y cuerpos lúteos (dos a más de once por animal) como respuesta a los diversos protocolos de superestimulación ovárica realizados en camélidos. También se observa una variación en el número de embriones transferibles por animal (entre cero y dos). Recientemente Bravo *et al.* (2004) reportaron una respuesta ovárica de 3 a 7 cuerpos lúteos y una media de 3.9 embriones después de un tratamiento con eCG.

2.5.3. Hormonas Utilizadas para la Superestimulación Ovárica

2.5.3.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Es una glucoproteína secretada por la adenohipófisis que favorece el crecimiento y maduración de los folículos y ovocitos. La administración de FSH en cantidades superiores a las secretadas fisiológicamente induce un mayor reclutamiento y desarrollo folicular logrando así un alto número de folículos preovulatorios. Debido a la corta vida media de la FSH (3 a 4 horas) es necesario administrar la dosis total distribuida en varias aplicaciones, generalmente en dosis decrecientes (Menchaca y Rubianes, 2003).

2.5.3.2. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)

La eCG antiguamente conocida como PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin o Suero de Yegua Preñada) es producida por el corion equino entre los 40 y 130 días de gestación (Menchaca y Rubianes, 2003).

Es una glicoproteína compleja con actividad FSH y LH (Murphy y Martinuk, 1991). En la yegua tiene función sobre los receptores de LH. En rumiantes tiene función sobre los receptores de FSH. Esto hace que el efecto central de la eCG en rumiantes sea inducir el desarrollo folicular y la ovulación (Menchaca y Rubianes, 2003).

Su extensa vida media permite una buena respuesta luego de una única dosis; sin embargo, su larga permanencia en circulación periférica es también su principal desventaja (Menchaca y Rubianes, 2003). Persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea de la vaca (Murphy y Martinuk, 1991).

La persistencia de niveles altos de eCG próximos al pico de LH genera un medio inadecuado para la maduración terminal de los folículos e incluso un excesivo desarrollo folicular luego de la ovulación. Esto eleva los niveles de estrógenos circundantes durante la fase luteal temprana aumentando la incidencia de cuerpos lúteos de regresión prematura con el subsiguiente efecto detrimento sobre la respuesta obtenida. A su vez, el efecto LH induce una temprana reasunción de la meiosis del ovocito, lo que provoca una disminución en la calidad ovocitaria (Menchaca y Rubianes, 2003).

Con el fin de evitar el sobreestímulo que se produce debido a la extensa vida media de la eCG, existe la posibilidad de administrar anticuerpos contra la eCG (suero anti eCG) luego de obtener el estímulo deseado. Dicho antisuero se administra en general pocas horas después de comenzar el estro promovido por la superestimulación (Menchaca y Rubianes, 2003). Dosis de 500 y 1000 ui de eCG fueron óptimas para inducir crecimiento folicular múltiple en llamas (Bravo *et al.*, 1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA, INIEA, PUNO. Ubicado a 4200 msnm, en el distrito de Santa Lucia, provincia de Lampa, departamento de Puno a 15°04' de latitud Sur y a 70°18' de longitud Oeste, durante los meses de Enero – Marzo.

3.2. ANIMALES

Llamas hembras, entre 4 - 6 años de edad y con historial de partos sin problemas fueron evaluadas con un ecógrafo ALOKA SSD 500 y un transductor lineal Modo B de 7.5 MHz para determinar el estado de desarrollo folicular ovárico. Cuarenta y cinco animales con presencia de folículos ≥ 7 mm fueron seleccionados para el estudio. Los animales recibieron el mismo manejo y fueron alimentados con pastura natural.

3.3. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

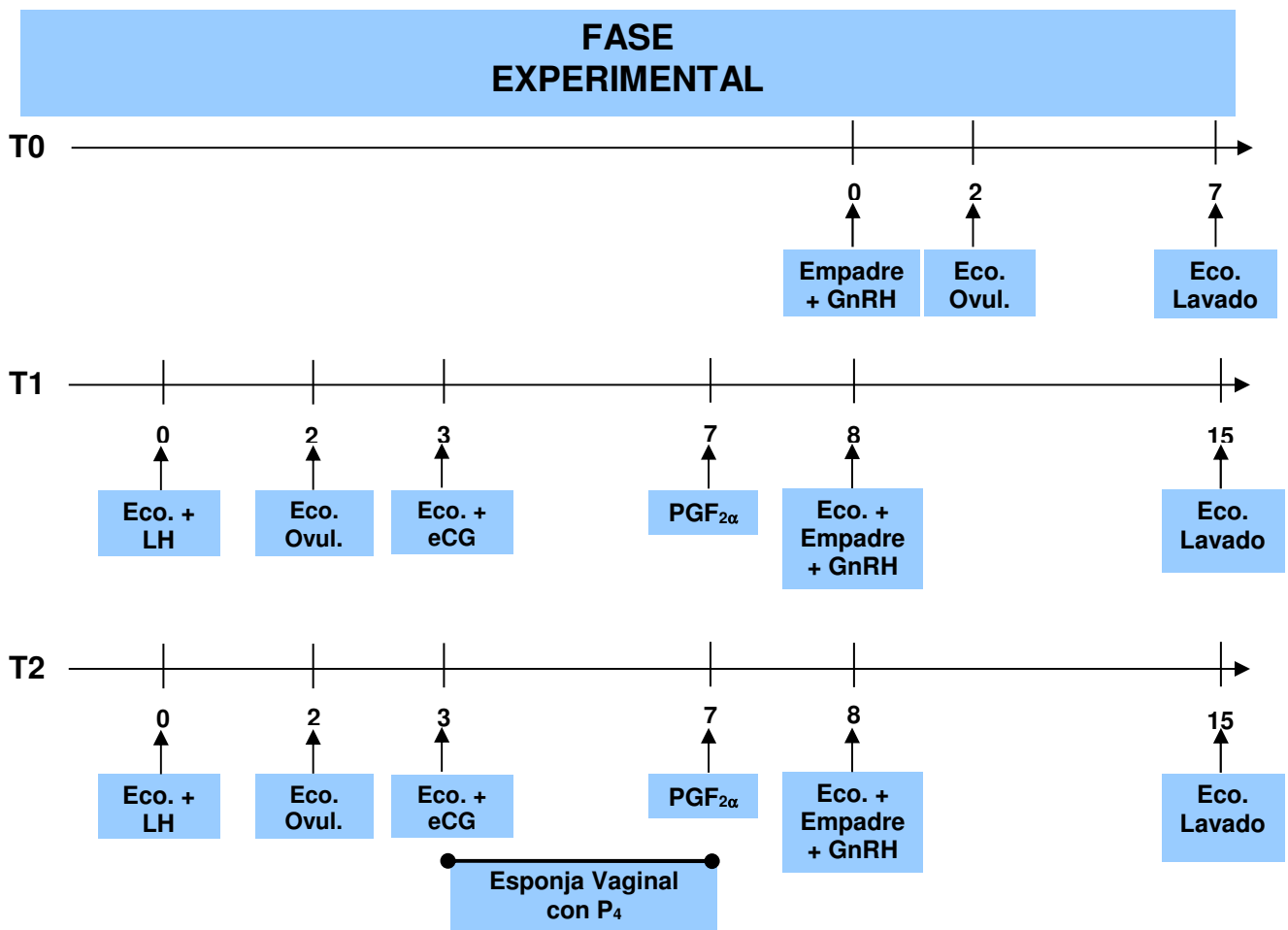
Los animales fueron distribuidos al azar en tres grupos, según se señala en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Grupos y Tratamientos Experimentales

Grupo	Tratamiento	Nº de hembras
T0	Sin tratamiento superovuladorio	15
T1	Aplicación de 1000 ui eCG durante fase no luteal	15
T2	Aplicación de 1000 ui eCG durante fase luteal	15

A continuación se presenta un esquema (Fig. 1.), con la finalidad de explicar los tratamientos experimentales.

Fig. 1. Tratamientos Experimentales



3.3.1. Tratamientos

3.3.1.1. T0 (No Estimulado)

Los animales de este grupo no fueron inducidos a sincronización de onda folicular, ni recibieron tratamiento superovulatorio. El día 0 se empadró a las hembras que presentaron folículo preovulatorio ≥ 7 mm a la ecografía y a la vez se aplicó 1 ml de Conceptal®, Intervet i.m. (GnRH equivalente a 0.0042 mg de acetato de buserelina) para asegurar ovulación. Los días 2 y 7 se evaluó la respuesta ovárica mediante ecografía.

3.3.1.2. T1 (Fase No Luteal)

El día 0 se aplicó 1 ml de Lutropin-V®, Bioniche Animal Health Canada Inc., i.m. (equivalente a 5 mg de LH) a los animales que presentaron folículo preovulatorio ≥ 7 mm para inducir ovulación y sincronizar la onda folicular. El día 2 se evaluó la respuesta ovulatoria mediante ecografía. El día 3 se aplicó 1000 ui de eCG (Folligon®, Intervet) i.m. como tratamiento superestimuladorio. El día 7 se aplicó 1 ml de Iliren®, Intervet i.m. (PGF_{2 α} equivalente a 0,150 mg de triaprost) para inducir luteólisis. El día 8 se observó el número de folículos preovulatorios, se efectuó la monta dirigida de los animales y se aplicó 1 ml de Conceptal®, Intervet i.m. (GnRH equivalente a 0.0042 mg de acetato de buserelina). El día 15 se evaluó la respuesta ovulatoria.

3.3.1.3. T2 (Fase Luteal)

Los animales recibieron un tratamiento similar al del grupo T1 (1 ml de LH el día 0 y evaluación ecográfica el día 2). Pero el día 3 se insertó una esponja vaginal impregnada con 60 mg acetato de medroxiprogesterona para simular fase luteal, y conjuntamente se aplicó 1000 ui de eCG (Folligon®, Intervet) i.m. como tratamiento superestimuladorio. El día 7 se efectuó la remoción de la esponja vaginal y la aplicación de 1 ml de Iliren®, Intervet i.m. (PGF_{2 α} equivalente a 0,150 mg de triaprost). El día 8 se realizó la evaluación de la respuesta ovárica, seguida del empadre y la aplicación de 1 ml de Conceptal®, Intervet i.m. (GnRH equivalente a 0.0042 mg de acetato de buserelina). El día 15 se evaluó la respuesta ovulatoria.

3.3.2. Lavado y colección de Embriones.

Para este procedimiento se uniformizó la técnica realizando el lavado de tres animales por día (un animal de cada grupo). El lavado y colección de los embriones se realizó el día 7 post-cópula (T0: día 7; T1 y T2: día 15). La técnica realizada para todos los grupos fue el lavado uterino transcervical.

A continuación se describe brevemente la técnica de acuerdo a lo descrito por Huanca y Huanca (2004). En primer lugar se procedió a colocar al animal en un brete y se aplicó 5 ml de lidocaína al 2 % en el espacio epidural caudal. Posteriormente se realizó la desinfección y secado de la zona del periné y la vulva. Se introdujo un catéter Foley de dos vías provisto de un mandril a través de vagina y cerviz hasta llegar a los cuernos uterinos. El balón del catéter Foley fue insuflado con 15 cm³ de aire para asegurarse de ocluir en forma total la luz del cuerno. Una vez fijado el catéter, el cuerno uterino fue lavado con un total de 250 ml de Suero Buffer Fosfato (PBS) a 35 °C de temperatura. El medio de lavado extraído fue filtrado utilizando filtros EMCOM (75 µ). Para la búsqueda de embriones, el contenido del filtro fue depositado en placas Petri, las cuales fueron revisadas con un microscopio estereoscopio a un aumento de 15x. Una vez identificado el embrión, se procedió a su lavado y se colocó en una placa Petri con 1 ml de PBS para su evaluación. El procedimiento se repitió con el otro cuerno uterino.

3.3.3. Evaluación de Embriones

La evaluación se realizó a un aumento de 50x. Los embriones se clasificaron de excelente (1) a intransferible (5) siguiendo la escala de clasificación embrionaria de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Escala de Clasificación Embrionaria de la IETS (Stringfellow y Seidel, 1990)

Grado	Características
1	Excelente calidad. No fragmentado, de forma esférica y simétrica, sin ninguna irregularidad y células completas.
2	Buena calidad. Bordes con algunas irregularidades en el contorno y muy poco daño en las células que lo conforman.
3	Mediana calidad. Embrión pequeño con zonas oscuras, contornos irregulares y con algunas células dañadas.
4	Mala calidad. Embrión colapsado. Muestran áreas de degeneración y muchas células destruidas.
5	Intransferible. Embriones colapsados muy oscuros o retardados, mórulas oscuras y todos los estadios más jóvenes a mórula u ovocitos sin fertilizar.

3.4. ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism ® Versión 3.0.

La prueba de Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) y Tukey fueron utilizadas para analizar el efecto de los tratamientos T0, T1 y T2 en las siguientes variables: número de folículos preovulatorios, número de cuerpos lúteos, tamaño de cuerpos lúteos y número de embriones colectados. Se determinó la tasa de recuperación embrionaria de los tratamientos T0, T1 y T2 al dividir el número de embriones colectados entre el número de cuerpos lúteos observados a la ecografía. Para determinar el grado de asociación entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones colectados en cada tratamiento, se utilizó el Análisis de Correlación. Los datos referentes a calidad embrionaria son presentados en porcentaje, tomando en cuenta el número de embriones colectados por tratamiento (T0, T1 y T2), el número de embriones colectados por calidad y el número total de embriones colectados.

IV. RESULTADOS

4.1. Respuesta Ovárica

El número de folículos preovulatorios observados en el estudio se muestran en el Cuadro 3. Los animales del grupo T1 (fase no luteal) respondieron en su totalidad al tratamiento superestimulador, mientras que dos de los quince animales del grupo T2 (fase luteal) no se observó folículos preovulatorios luego de la aplicación del tratamiento. Así mismo se observó la formación de once quistes (de aproximadamente 25 mm) en el grupo T2 y tres quistes en el grupo T1.

Cuadro 3. Folículos Preovulatorios.

	No estimulado (T0) (n =15)	No Luteal (T1) (n =15)	Luteal (T2) (n =13)
Nº Fol. Pre. Ovul. Total	16	166	98
Nº Prom. Fol. Pre. Ovul*	1,07 ± 0,07 ^a	11,07 ± 1,94 ^b	7,07 ± 1,99 ^b

*Valores son promedios ± error estándar

Letras diferentes (^{a, b, c}) muestran diferencias significativas (P< 0,05) entre columnas.

En el grupo T1 existió un mayor número de folículos preovulatorios en comparación con el grupo T2, además el promedio de folículos preovulatorios en T1 (11,07 ± 1,94) fue significativamente mayor (P< 0,001) que en T0 (1,07 ± 0,07).

Al realizar el empadre, se observó que el 100% de los animales de los grupos T0 y T1 presentaron receptividad al macho; sin embargo, en el grupo T2 se observó que sólo

cinco de los trece animales presentaron conducta de receptividad al macho. En tanto que los ocho restantes precisaron de ayuda para la realización de la cópula (empadre forzado).

El porcentaje de animales que ovularon en el grupo T0 y T1 fue de un 100 %; sin embargo, se pudo apreciar que uno de los trece animales del grupo T2 no llegó a ovular (92,31%) es por ello que este animal fue considerado sólo en la primera fase del estudio (respuesta ovárica). El porcentaje de folículos que ovularon se determinó al confrontar el número de cuerpos lúteos post-cópula con el número de folículos preovulatorios, dicho porcentaje fue de un 100 % (16/16) para el grupo T0, para el grupo T1 fue de un 83,13 % (138/166), mientras que para el grupo T2 fue de un 92,86 % (91/98). En el Cuadro 4. se muestran los porcentajes de ovulación en los diferentes tratamientos.

Cuadro 4. Porcentajes de Ovulación.

	No estimulado (T0) (n =15)	No Luteal (T1) (n =15)	Luteal (T2) (n =13)
% de Animales que ovularon	100	100	92,31
% de Folículos que ovularon	100	83,13	92,86

Con respecto al número promedio de cuerpos lúteos, se observa que la respuesta fue mayor en el grupo T1 ($9,27 \pm 0,87$) en comparación con el grupo T2 ($6,47 \pm 1,11$) ($P < 0.05$), además, se observó que ambos grupos tuvieron una mayor respuesta con respecto al grupo T0 ($1,07 \pm 0,07$) ($P < 0.001$).

En el Cuadro 5. se muestran el número y tamaño de los cuerpos lúteos formados en los diferentes tratamientos.

Cuadro 5. Formación de Cuerpos Lúteos.

	No estimulado (T0) (n =15)	No Luteal (T1) (n =15)	Luteal (T2) (n =12)
Nº Cuerpos Lúteos Total	16	138	91
Nº Prom. Cuerpos Lúteos *	$1,07 \pm 0,07^a$	$9,27 \pm 0,87^b$	$6,47 \pm 1,11^c$
Tam. Prom. Cuerpos Lúteos (mm)*	$11,19 \pm 0,32^a$	$10,78 \pm 0,20^a$	$11,46 \pm 0,31^a$

*Valores son promedios \pm error estándar

Letras diferentes ^(a, b, c) muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) entre columnas.

Así mismo, se pudo determinar que no existió diferencia estadística en el tamaño promedio de los cuerpos lúteos observados en los tres grupos ($P > 0,05$).

4.2. Calidad Embrionaria.

Al observar los datos podemos encontrar que el grupo T1 es el que presenta mayor número y mejor calidad de embriones colectados en comparación con el grupo T2.

En el Cuadro 6. se muestran el número total y el promedio de embriones colectados por tratamiento.

Cuadro 6. Número de Embriones Colectados.

	No estimulado (T0) (n =15)	No Luteal (T1) (n =15)	Luteal (T2) (n =12)
Nº Total Embriones recuperados	5	52	20
Nº Prom. Embriones*	$0,33 \pm 0,32^a$	$3,47 \pm 0,20^b$	$1,33 \pm 0,31^{ab}$
Tasa de Recuperación embrionaria¹	31,25 %	37,68 %	21,98 %

*Valores son promedios \pm error estándar.

¹(Nº embriones recuperados/Nº cuerpos luteos) x 100.

Letras diferentes (a, b, c) muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) entre columnas.

Se recuperaron 52 embriones en el grupo T1, siendo este el mayor número total de embriones recuperados por grupo, ya que en el grupo T0 se colectaron un total de 5 embriones, mientras que en el grupo T2 fueron 20 embriones. Sin embargo, al aplicar la estadística, observamos que no existe diferencia significativa en el número promedio de embriones entre los grupos T1 y T2 ($P > 0,05$).

La tasa de recuperación embrionaria más alta del estudio fue la hallada en el grupo T1 (37,68 %), mientras que la más baja fue la hallada en el grupo T2 (21,98); siendo la tasa de recuperación embrionaria total de 31,43 % ($[77/245] \times 100$).

En el Cuadro 7. se muestra el porcentaje de calidad de los embriones colectados.

Cuadro 7. Porcentaje de Calidad de Embriones Colectados.

Grados de Calidad	No estimulado (T0) (n =15)	No Luteal (T1) (n =15)	Luteal (T2) (n =12)	Total Calidad 42
1 (Excelente)	3 (60 %)	46 (88.46 %)	8 (40 %)	57 (74,03 %)
2 (Buena)	1 (20 %)	4 (7.69 %)	6 (30 %)	11 (14,29 %)
3 (Mediana)	0 (0 %)	0 (0 %)	5 (25%)	5 (6,49 %)
4 (Mala)	1 (20 %)	2 (3.85 %)	1 (5%)	4 (5,19%)
5 (Intransferible)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Total	5 (100 %)	52 (100 %)	20 (100 %)	77 (100 %)

Hay que indicar que del total de embriones colectados el 74,03 % fueron grado 1, el 14,29 % de grado 2, el 6,49 % de grado 3, el 5,19 % de grado 4 y ningún embrión de grado 5. También se puede observar que en el grupo T1 se encuentra el 80,70 % (46/57) del total de los embriones de calidad 1, mientras que en el grupo T2 se encuentra el 100 % (5/5) del total de los embriones de calidad 2.

Además al realizar el análisis de correlación se comprobó que existe correlación positiva entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones colectados por grupo, existiendo una correlación de $r = 0.4439$ en el grupo T1 y de $r = 0.2087$ en el grupo T2.

V. DISCUSIÓN

Al realizar la aplicación de los tratamientos de superestimulación ovárica tanto en fase luteal como no luteal, se pudo obtener una respuesta favorable en todos los animales del grupo T1 (fase no luteal), observándose el desarrollo de una nueva onda folicular con folículos \geq de 7 mm, en cambio, en el grupo T2 la respuesta no fue tan satisfactoria, ya que se pudo determinar que dos animales no respondieron al tratamiento. El hallazgo de estos dos animales nos lleva a pensar que a pesar del efecto estimulador de la FSH y LH que posee la eCG, existe una notoria inhibición del crecimiento folicular posiblemente debido a la aplicación de progesterona exógena la fue aplicada con el fin de simular una fase luteal. Esto sugiere que la progesterona aplicada en forma exógena, podría actuar en forma sistémica mediante un efecto inhibitorio sobre la secreción de la GnRH y LH, y posiblemente en forma local, mediante la interferencia de la síntesis de receptores FSH y LH, contribuyendo a inhibir el crecimiento folicular ovárico. Es decir, la aplicación de eCG conjunta con la aplicación de la esponja vaginal conteniendo progesterona para el grupo T2, podría ser la causante de la baja respuesta presentada por dicho grupo.

Al momento de realizar el empadre dirigido los grupos T0 y T1 contaban con quince animales en estudio, mientras que el grupo T2 sólo contaba con trece animales, por las razones anteriormente explicadas (ausencia de respuesta al tratamiento superovulatorio). Un hecho muy interesante es que ocho de los trece animales del grupo T2 no se mostraron receptivas al momento del empadre, por lo cual este se realizó en forma forzada. Este comportamiento de rechazo al macho (falta de receptividad) fue señalado por Santiani *et al* (2002) quienes plantean que dicho comportamiento está influenciado por la aplicación de progesterona exógena. Ya que según lo sugerido por Novoa y Leyva (1996)

el estrógeno es el responsable del comportamiento de receptividad sexual en alpacas y llamas. Es así que al actuar la progesterona como inhibidora de la secreción de GnRH y FSH a nivel hipófisis hipotálamo, impediría la aromatización de los andrógenos y por lo tanto inhibiría la formación de estradiol a nivel ovárico.

Es notable resaltar que el porcentaje de animales que ovularon en el grupo T1 fue de un 100 %, lo cual puede deberse a la influencia de los desencadenantes de la ovulación como fue la realización conjunta de la cópula y la aplicación de GnRH. Sin embargo, al observar el porcentaje de animales que ovularon, es notable resaltar que a pesar de la mayor tasa ovulatoria que presentó el grupo T2, fue en el grupo T1 que se encontró el mayor número de folículos preovulatorios y el mayor número de embriones recuperados.

Todos estos resultados nos sugieren, que la aplicación del tratamiento superestimulador con eCG conjuntamente con la aplicación de la esponja vaginal conteniendo progesterona (fase luteal) no produce una buena respuesta ovárica, ya que la progesterona liberada por la esponja vaginal ejerce un efecto inhibitorio en el desarrollo de folículos dominantes (Santiani *et al.*, 2002) estimulados por la eCG durante el tiempo que dura el tratamiento con progesterona, lo cual se debe a la limitación del crecimiento folicular por el efecto inhibitorio a nivel del hipotálamo y por la inducción de la atresia del folículo dominante debido a la acción local de la progesterona en el ovario.

La tasa de recuperación embrionaria más alta hallada en el presente trabajo, fue la observada en el grupo T1 (37,68 %), la cual se encuentra dentro del rango esperado, ya que estudios realizados anteriormente señalan que la tasa de colección embrionaria en llamas y alpacas varía entre el 0% (Correa *et al.*, 1994) hasta el 50% en el mejor de los casos (Del Campo *et al.*, 1995).

La tasa de recuperación embrionaria hallada en el grupo T2 fue de un 21,98 %, esta respuesta, baja en comparación con los otros dos grupos, posiblemente se deba al efecto negativo que presenta los niveles altos de progesterona sobre los embriones en estadios tempranos, lo cual coincidiría con lo reportado por Schacht y Foote (1978) en conejos, quienes encontraron que estos niveles altos de progesterona causan embriotoxicidad a nivel uterino durante los días 2 a 4 de vida embrionaria.

Se debe tomar en cuenta que el 100 % (77/77) de los embriones recuperados en el presente estudio fueron calificados como fértiles y transferibles aunque de diversos grados de calidad, lo cual es superior a lo hallado por Correa *et al.* (1997) quien obtuvo un 90,48 % (19/21) de embriones clasificados como fértiles y un 9,52 % (2/21) fue clasificado como muertos o degenerados.

En la actualidad no existen trabajos que especifiquen la calidad de los embriones producto de la superestimulación ovárica con eCG tanto en fase luteal como no luteal, es por ello que el presente estudio significa un gran aporte para la determinación de los grados de calidad embrionaria que se puede conseguir con dichos protocolos, y si es factible el uso de dichos protocolos para la obtención de embriones de excelente calidad.

Se pudo determinar que el 88,96% de los embriones obtenidos en el grupo T1 (fase no luteal) son de excelente calidad y que el 30% de embriones obtenidos en el T2 (fase luteal) son de mediana y mala calidad. Además se ha determinado que existe una correlación positiva entre el número de cuerpos lúteos y el número de embriones colectados en ambos grupos.

La formación de un grupo no tratado (T0) nos ayudó a determinar la respuesta ovárica y ovulatoria normal que se observa post-cópula y posterior a la aplicación de GnRH, pero sobre todo nos ayudó a determinar la calidad de los embriones propios de una ovulación sin influencia de hormonas exógenas.

La información proporcionada por el presente trabajo es importante para el establecimiento de un adecuado protocolo de superovulación para la especie, lo cual conllevaría al un uso más eficiente de dicha técnica.

VI. CONCLUSIONES

- El número y la calidad de embriones producto de una superestimulación en fase no luteal es mayor, en comparación con los embriones resultantes de una superestimulación en fase luteal.
- La progesterona exógena (fase luteal) inhibe el desarrollo de los folículos de una nueva onda folicular, es por ello que al realizar el tratamiento superovulatorio con eCG en presencia de altos niveles de progesterona, se observa una baja e inadecuada respuesta a dicho tratamiento.

VII. RECOMENDACIONES

- Para realizar la formulación de nuevos protocolos reproductivos para la especie, debería tomarse en cuenta en un inicio de la formulación de dichos protocolos, la característica que presenta el ser una especie de ovulación inducida.
- Es sumamente importante establecer cual es el papel que desempeña la progesterona durante los primeros estadios del embrión y cual es la dosis mínima de progesterona que puede alterar el número y la calidad de los embriones producto de una superovulación.
- Se recomienda la aplicación de anti-eCG, para evitar una excesiva estimulación del crecimiento folicular y la formación de quistes foliculares.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aba, M.; Forsberg, M. Kinvahl, M.; Sumar, Y.; Edqvist, L. 1995.** Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet. Scand.* 36: 489-498.
2. **Adams, G; Sumar, J.; Guinther, O. 1990.** Effect of lactation and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod. Fertil.* 90: 535-545
3. **Adams, G; Sumar, J; Ginther, O. 1991.** Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 24: 127-138.
4. **Adams, G. 2001.** Comparative aspects of follicular dynamics in camelids. *Rev. Inv. Vet. Perú. Suplemento.* 1: 142-147.
5. **Adams, G; Ratto, M; Huanca, W; Singh, J. 2005.** Ovulation-Inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol. Reprod.* 73: 452-457.
6. **Bourke, D.A.; Adam C.L.; Kyle, C.E.; Young, P.; Mcevoy, T.G. 1992a.** Superovulation and embryo transfer in the llama. In: *Proc. 1st Int. Camel Conference Newmarket.* pp. 183-185.
7. **Bourke, D.A.; Adam C.L.; Kyle, C.E. 1992b.** Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Vet. Rec.* 130: 424-428.
8. **Bourke, D.A.; Kyle, C.E.; Mcevoy, T.G.; Young, P.; Adam, C.L. 1995.** Superovulatory responses to eCG en llamas (*Lama glama*). *Theriogenology.* 44: 255-268.
9. **Bravo, P.W.; Sumar, J. 1989.** Laparoscopy examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 21: 271-281
10. **Bravo, W.; Fowler, M.; Stabenfeldt, G.; Lasley, B. 1990.** Ovarian follicular dynamics in the Llama. *Biol. Reprod.* 43: 579-585.

11. **Bravo, P.W.; Stabenfeldt, G.; Lasley, B.; Fowler, M. 1991.** The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American Camelids. *Biol. Reprod.* 45: 553-559
12. **Bravo, P.W.; Tsutsu, T.; Lasley, L. 1995.** Dose response to equine chorionic gonadotropin and subsequent ovulation in llamas. *Small Ruminant Research.* 18(2): 157-163.
13. **Bravo, P.W.; Moscoso, J.; Ordonez, C.; Alarcon, V. 1996.** Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Anim Reprod Sci.* 43: 173-179.
14. **Bravo, P.W. 1997.** Ovarian function in domesticated South American camelids. In: *Current therapy in large animal Theriogenology.* Edit by Younquist, R. Vol II. Saunders Company Philadelphia. pp. 803-806.
15. **Bravo, P.W. 2002.** Cap I Female reproduction. The reproductive process of South American camelids. Seagull Printing Sale Lake City. UT. United States of America.
16. **Bravo, P.W.; Cosio, E.; Alarcón, V.; Ordoñez, C. 2004.** The first 10 days of the alpaca embryo. In: 15th International Congress on Animal Reproduction. Abstract. Porto Seguro. Brazil. pp. 84
17. **Chaves, M.G.; Aba, M.A.; 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. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 37-46.
18. **Correa, J.E.; Ratto, M.H.; Gatica, R. 1994.** Actividad estral y respuesta ovárica en alpacas y llamas tratadas con progesterona y gonadotropinas. *Arch. Med. Vet.* 26: 59-64.
19. **Correa, J.E.; Ratto, M.H.; Gatica, R. 1997.** Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and eCG used individually or combination. *Anim. Reprod. Sci.* 46: 289-296.
20. **Cunningham, J. 2003.** Fisiología Veterinaria. Elsevier. España. 3era Edición. p. 592.
21. **Del Campo, M.; Del Campo, H.; Adams, G.; Mapletoft, R. 1995.** The application of new reproductive technologies to South American camelids. *Theriogenology.* 43: 21-30.
22. **Del Campo, M.; Toro, F.; Von Baer, A.; Montecinos, S.; Donoso, X.; Von Baer, L. 2002.** Morphology and physiology of llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama paco*) embryos. *Theriogenology.* 57: 581. Abst.
23. **Fernández-Baca, S.; Hansel, W.; Novoa, C. 1970a.** Corpus luteum function in the alpacas. *Biol. Reprod.* 3(2): 252-261.

24. **Fernández-Baca, S.; Madden, D.L.H.; Novoa, C. 1970b.** Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J. Reprod. Fertil.* 22: 261-267.
25. **Fernández-Baca, S. 1971.** La alpaca. Reproducción y crianza. Boletín N° 7. IVITA. UNMSM. Lima. pp. 43
26. **Fernández-Baca, S.; Novoa, C.; Sumar, J. 1972.** Actividad reproductiva en la alpaca mantenida en separación del macho. Asociación Latinoamericana de Producción Animal (A.L.P.A.) Mem. 7: 7-18.
27. **Fernández-Baca, S. 1993.** Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 307-323.
28. **Hafez, E.S.E.; Hafez, B. 2002.** Reproducción e inseminación artificial en animales. Interamericana - Mc Graw Hill. México. 7ma. Edición. p. 532
29. **Huanca, W.; Cárdenas, O.; Cordero, A.; Huanca, T.; Sapana, R. 1999.** Respuesta ovárica a gonadotropinas (eCG y hCG) en alpacas durante la época seca. En: Res. II Cong. Mund. Camélidos. Cusco. pp. 92
30. **Huanca, W.; Cárdenas, O.; Olazábal, C.; Ratto, M.; Adams, G.P. 2001.** Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Rev. Inv. Vet. Perú.* Suplem. 1:462-463. Lima - Perú.
31. **Huanca, W.; Huanca, T. 2004.** Transferencia de embriones en camélidos sudamericanos. *Rev. Mundo Veterinario.* 2(6): 12-16.
32. **Kanagawa, H.; Shimohira, I.; Sayito, N. 1995.** Manual of bovine embryo transfer. Japan Livestock Technology Association. Japón. pp. 153-167.
33. **Kmaid, S.; Ungerfeld, R.; Rubianes, E. 2003.** Técnicas de colección y transferencia de embriones en pequeños rumiantes. En: Reproducción en los animales domésticos. Tomo II. Melibea Ediciones. Montevideo. Uruguay. pp. 567-572.
34. **Leyva, V. 1996.** Follicular activity and ovulation of ewes during the breeding season and anestrus. Tesis PhD. Univ. Guelph. Canadá.
35. **Leyva, V.; García, W. 1999a.** Efecto de la progesterona exógena sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. Cusco. pp. 87.
36. **Leyva, V.; García, W. 1999b.** Efecto de la prostaglandina sobre la vida del cuerpo lúteo en alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. Cusco. pp. 88.
37. **López, A. 2004.** Inducción de la Ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal proveniente de llama, alpaca y bovino. Tesis para optar el Título de Medico Veterinario- UNMSM-FMV-Lima-Perú. 41pp.

38. **Menchaca, A.; Ungerfeld, R.; De Castro, T.; Rubianes, E. 2003.** Tratamientos hormonales para la inducción y sincronización de celos en ovejas. En: Reproducción en los animales domésticos. Tomo II. Melibea Ediciones. Montevideo. Uruguay. pp. 483-491.
39. **Menchaca, A.; Rubianes, E. 2003.** Superovulación en pequeños rumiantes. En: Reproducción en los animales domésticos. Tomo II. Melibea Ediciones. Montevideo. Uruguay. pp. 539-548.
40. **Miragaya, M.H.; Chaves, M.G.; Agüero, A. 2005.** Reproductive biotechnology in South American camelids. Small Ruminant Research
41. **Murphy, B.; Martinuk, D. 1991.** Equine Chorionic Gonadotropin. Endocrine Reviews. 12: 27-44.
42. **Novoa, C.; Sumar, J. 1968.** Colección de huevos in vivo y ensayos de transferencia en alpacas. Bol. Ext. IVITA (Perú) 3: 31-34.
43. **Novoa, C.; Fernández-Baca, S.; Sumar, J.; Leyva, V. 1972.** Pubertad en la alpaca. Rev. Inv. Pec. (IVITA) UNMSM. 1(1): 29-35.
44. **Novoa, C. 1991.** Fisiología de la Reproducción de la Hembra. In: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Cap. III. Edi. Fernández-Baca, S. Santiago pp. 99-100.
45. **Novoa, C.; Leyva, V. 1996.** Reproducción en alpacas y llamas. Publicación científica. IVITA. 26 (30): 3-18.
46. **Novoa, C.; Franco, E.; García, W.; Pezo, D. 1999.** Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. Rev. Inv. Vet. Perú. 10(1): 48-53.
47. **Ratto, M.H.; Gatica, R.; Correa, J.E. 1997.** Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*) treated with pFSH. Anim. Reprod. Sci. 48: 325-330.
48. **Ratto, M.H.; Gomez, C.; Wolter, M.; Berland, M.; Adams, G. 1999.** Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. En: Res. II Cong. Mund. Camélidos. Cusco. pp. 96-97.
49. **Ratto, M.H.; Singh, J.; Huanca, W.; Adams, G.P. 2003.** Ovarian follicular wave synchronization and fixed-time natural insemination in llamas. Theriogenology. 60: 1645-1656.
50. **San-Martín, M.; Copaira, M.; Zúñiga, J.; Rodríguez, R.; Bustinza, G.; Acosta, L. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. J. Reprod. Fertil. 16: 395-399.

51. **Santiani, A.; Leyva, V.; García, W. 2002.** Efecto inhibitorio de la progesterona sobre el desarrollo de la onda folicular en llamas. *Rev. Inv. Vet. Perú* 13(2): 10-17.
52. **Schacht, C.J.; Foote, R.H. 1978.** Progesterone induced asynchrony and embryo mortality in rabbits. *Biol. Reprod.* 19: 534-539.
53. **Smith, C. 1994.** Reproduction in Llamas and alpacas: A review. *Theriogenology* 41: 573-592.
54. **Stringfellow, D.A.; Seidel, G.E., 1990.** Manual of the International Embryo Transfer Society, 2nd ed. Illinois.
55. **Sumar, J.; Leyva, V.; Franco, E.; Foot, W. 1987.** Incidence of estrus and spontaneous ovulation in huacaya type alpaca. *Improv. Reprod. Performol. Small ruminates. US/Aid. Title XII Small Ruminates – CRSP. Final Reports 6.2.6.*
56. **Sumar, J. 1993.** Efectos de los estímulos de inducción en la ovulación de alpacas y llamas. *Rev. Pec. IVITA. Perú.* 6 (1): 17-21.
57. **Sumar, J. 1996.** Reproduction in llamas and alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 405-415.
58. **Sumar, J.; Adams, G. 1997.** Reproductive Anatomy and Physiology of the female Llama. En: *Current therapy in large animal theriogenology.* Edit by Younquist, R. Vol II. Saunders Company Philadelphia. pp. 792-798.
59. **Vásquez, M. 2005.** Efecto del plasma seminal, separado en base al peso molecular, sobre la inducción de ovulación en llamas (*Lama glama*). Tesis para optar el Título de Medico Veterinario- UNMSM-FMV-Lima-Perú. 52pp.
60. **Vaughan, J. 2001.** Control of follicular waves in alpacas. *Rev. Inv. Vet. Peru: Suplem.* 1:112-114. Lima. Perú.
61. **Vaughan J, Macmillan KL, D’Occhio MJ. 2004.** Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 353-361
62. **Velásquez, C.; Novoa, C. 1999.** Superovulación con PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 10(1): 39–47.
63. **Vivanco, H.W.; Greaney, K.B.; Varela, H. 1994.** Explaining the variability in superovulation responses and yielded of transferable embryos in sheep embryo transfers. *Theriogenology.* 41:329.
64. **Zhao, X.X.; Huang, Y.M.; Chen, B.X. 1990.** Biological activity of gonadotrophin releasing hormone like factors in the seminal plasma of the bactrian camel. *Proc. 1° Int. Camel. Conf.* pp. 163-168.