

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

Estudio del efecto del estadio del desarrollo folicular al momento de la monta sobre la ovulación y sobrevivencia embrionaria en alpacas

TESIS Para optar el Título Profesional de MÉDICO VETERINARIO

AUTOR

MIRIAM PILAR CERVANTES FLORES

ASESOR: WILFREDO HUANCA LOPEZ

LIMA – PERÚ 2004

DEDICATORIA

A Mario y Angelita, mis padres por su inmenso amor, comprensión, dedicación, apoyo y por enseñarme con su ejemplo que debemos tener la fortaleza de continuar hacia adelante sin que importen las circunstancias que se nos presenten en la vida.

A Pol, Jim, Vero, César, mis hermanos, por su cariño incondicional, momentos vividos y consejos, incluso aún en la distancia.

A Manuel por su amor, respeto, apoyo, y compañía en cada etapa del camino recorrido juntos y, en aquellos momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Wilfredo Huanca por su amistad, comprensión, confianza, compañía, tiempo brindado para el desarrollo del presente estudio y por su enseñanza en todo este proceso.

Al Dr. Víctor Leyva Vallejos, por su tiempo, colaboración, apoyo y consejos brindados.

Al Dr. César Gavidia por su amistad, tiempo y apoyo en la redacción de la tesis.

*A todos mis amigos quienes de manera muy oportuna colaboraron con el desarrollo del presente trabajo.
Gracias Alexei, Alicia, Shirley, Marco.*

Al Proyecto de Camélidos Sudamericanos INIA-Puno, Anexo Quimsachata, por su contribución en el desarrollo de la parte experimental de este trabajo y por las facilidades brindadas, en especial a los Doctores Teodosio Huanca, Rómulo Sapana, Nolberto Apaza y al personal técnico.

*A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por acogerme **en sus aulas** y darme la oportunidad de formarme académicamente.*

A Dios por poner en mi, camino a tantas personas, quienes han contribuido de forma significativa a salir adelante en los momentos más difíciles y a pasar grato, momentos en el transcurso de esta etapa académica. Gracias Gina, Nidia, Johana, Elizabeth, Melina, Susan, Alex, Carlilos, Jimmy, Luis G., Hugo.

ÍNDICE

Resumen	viii
Abstract	ix
Lista de Cuadros	x
Lista de Figuras	xi
I.- INTRODUCCIÓN	2
II.- REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. Fisiología reproductiva en la hembra	2
2.1.1. Pubertad	2
2.1.2. Comportamiento sexual	3
2.1.3. Ovulación	4
2.1.4. Cuerpo Lúteo	7
2.2. Endocrinología y dinámica folicular	8
2.2.1. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en la hembra	8
2.2.2. Dinámica folicular	10
2.2.3. Dinámica folicular en camélidos sudamericanos	12
2.3. Gestación	13
2.3.1. Fertilización y gestación temprana	13
2.3.2. Mortalidad embrionaria temprana	15
2.3.3. Gestación media y avanzada	17
2.5. Ultrasonografía en reproducción	18
2.6. Aplicación de otras técnicas diagnósticas de gestación en camélidos	19
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1.- Lugar de estudio	21
3.2.- Animales	21

3.3.- Diseño experimental	21
3.4. Procedimiento metodológico	22
3.5. Análisis estadístico	24
IV.- RESULTADOS	25
4.1. Tasa de ovulación	25
4.2. Tasa de sobrevivencia embrionaria	26
4.3. Tamaño del cuerpo lúteo el día 9 post cópula	27
4.4. Receptividad sexual	28
V.- DISCUSIÓN	29
VI.- CONCLUSIONES	32
VII.- BIBLIOGRAFÍA	33
VIII.- APÉNDICES	41

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de los estadios de desarrollo folicular: crecimiento, estático y regresión del folículo dominante al momento de la cópula, sobre la ovulación y sobrevivencia embrionaria en alpacas. Se utilizaron 116 alpacas con descanso post parto ≥ 15 días, a las que se realizó evaluaciones con un ecógrafo Aloka SSD 500 y transductor lineal 7.5 MHz, para distribuir las alpacas al azar a uno de los 4 grupos siguientes: G1 (folículo dominante en estadio de crecimiento, diámetro 6 mm), G2 (folículo dominante en estadio de crecimiento, diámetro $\geq 7 \leq 12$ mm), G3 (folículo dominante en estadio estático, diámetro ≥ 7 mm) y G4 (folículo dominante en estadio de regresión, diámetro ≥ 7 mm). Posteriormente, fueron sometidas a empadre controlado dirigido, a excepción de 5 alpacas del grupo G1 que rechazaron al macho. El día del empadre fue considerado el día 0 y las evaluaciones ecográficas posteriores se realizaron en los días 2 (ocurrencia de ovulación), 9 (presencia y tamaño del cuerpo lúteo), 20, 25, 30 y 35 (presencia de vesícula embrionaria y/o embrión). En los días 0 y 15 post cópula se realizó la prueba de receptividad sexual. El 97,3% de las alpacas que fueron empadradas (n = 111) presentaron ovulación al día 2 post cópula, sin diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los 4 grupos (G1=95.45%, G2=96.67%, G3=100% y G4=96.56%). La tasa de sobrevivencia embrionaria no presentó diferencia significativa entre grupos, pero hubo una tendencia a una mayor tasa de sobrevivencia para el grupo G2 (65,52%) en comparación con los grupos G1(52,38 %), G3(53,33 %) y G4(42,86 %) al día 35 post cópula. En el día 9 post cópula, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño promedio del cuerpo lúteo entre los grupos (G1 = 10.28 ± 1.74 mm, G 2 = 11.72 ± 1.73 mm, G3= 11.07 ± 1.96 mm, G4 = 11.11 ± 2.23 mm). Estos resultados indicarían que el estadio del desarrollo folicular al momento de la monta no tendría efecto significativo sobre la tasa de ovulación y sobrevivencia embrionaria en alpacas.

Palabras clave: Alpacas, ecografía, estadios foliculares, ovulación, sobrevivencia embrionaria

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of growth, static and regression stages of the dominant follicle during mating, on the ovulation and the embryonic survival in alpacas. 116 female alpacas with a post-partum resting period ≥ 15 days were used. The alpacas were evaluated with an ultrasound scanner Aloka SSD 500 with a 7.5 MHz transrectal transducer in order to distribute them randomly in one of the following 4 groups: G1 (dominant follicle in growth stage, diameter of 6 mm), G2 (dominant follicle in growth stage, diameter $\geq 7 \leq 12$ mm), G3 (dominant follicle in static stage, diameter ≥ 7 mm) and G4 (dominant follicle in regression stage, diameter ≥ 7 mm). Subsequently, all the alpacas were mated with a male, except 5 alpacas of group G1 that rejected the male. The mating day was considered day 0, thus the subsequent ultrasound evaluations were carried out on days 2 (occurrence of ovulation), 9 (presence and size of the corpus luteum); 20, 25, 30 and 35 (presence of the embryonic vesicle and/or the embryo). On days 0 and 15, the sexual receptiveness test was performed. 97.3% of alpacas that were mated (n=111) presented ovulation, but no significant differences ($p < 0.05$) among the study groups (G1=95.45%, G2=96.67%, G3=100% and G4=96.56%) were observed. The embryonic survival rate was also not significantly different among the groups, but there was a tendency to a greater rate of survival for the group G2 (65.52%) in comparison with groups G1 (52.38%), G3 (53.33%) and G4 (42.86%) on day 35 after mating. On day 9, no significant difference in the average size of the corpus luteum was observed among the groups (G1 = 10.28 ± 1.74 mm, G2 = 11.72 ± 1.73 mm, G3 = 11.07 ± 1.96 mm, G4 = 11.11 ± 2.23 mm). These results suggest that the stage of the follicular development during mating does not have a significant effect on the rate of ovulation and embryonic survival in alpacas.

Key words: Alpacas, ultrasound, follicles development, ovulation, embryonic survival.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tasa de sobrevivencia embrionaria en alpacas con folículo en fase de crecimiento (G1 y G2), fase estática (G3) y en fase de regresión (G4) al momento de la monta	27
Cuadro 2. Receptividad sexual al día 15 post cópula por grupos en relación a la condición de preñez al día 20 post cópula	28

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Diseño Experimental	23
Fig. 2.- Tasa de ovulación en el día 2 post cópula	24
Fig. 3. Curva de supervivencia de Kaplan Meier para el período de observación	26
Fig. 4.- Tasa de supervivencia embrionaria en los 4 grupos en estudio (G1, G2, G3 y G4) en el día 35 post cópula	26
Fig. 5.- Tamaño promedio del cuerpo lúteo en el día 9 post cópula	27
Fig. 6.- Receptividad sexual al día 15 en relación a la condición de preñez en alpacas, al día 20 post cópula	28

I.- INTRODUCCIÓN

La explotación alpaquera es una actividad de gran importancia socio-económica para el poblador andino; porque suministra fibra valiosa para la industria textil y carne como fuente importante de proteína animal (Fernández Baca, 1971). Sin embargo, una de las principales limitantes en el desarrollo de la ganadería alpaquera es la baja eficiencia reproductiva, donde la alta mortalidad embrionaria desempeña un rol de gran importancia (Novoa, 1991).

Existen diversos factores relacionados con la mortalidad embrionaria y un posible factor podría estar relacionado con el estadio de desarrollo del folículo dominante al momento de la monta y con la receptividad sexual de la alpaca. La alpaca puede aceptar la cópula hasta por 40 días (Novoa, 1989), con períodos de no receptividad no mayores de 2 días; atribuido a la presencia de ondas foliculares continuas de larga duración, con la consiguiente secreción de estrógenos (Novoa, 1989; Fernández Baca, 1993) y aceptación al macho en cualquiera de sus estadios foliculares (Bravo et al., 1991; Sumar, 1997). El estudio sobre las características del folículo en desarrollo, nos proporcionará información para un mejor conocimiento de los factores involucrados en la fisiología reproductiva de la alpaca.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los estadios de crecimiento, estático y regresión del folículo dominante al momento de la cópula, sobre la ovulación y sobrevivencia embrionaria en alpacas.

II. - REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Fisiología reproductiva en la hembra

2.1.1. Pubertad

La pubertad, en los mamíferos, se alcanza cuando el animal es capaz de liberar gametos y de manifestar comportamiento sexual.

Si bien los mecanismos endocrinológicos sobre el inicio de la pubertad no se han descrito en camélidos sudamericanos, en otras especies se sugiere que la inactividad hipotalámica es la responsable de mantener el estado prepuberal; evidencias señalan que en bovinos y ovinos existe un efecto de retroalimentación negativa de los estrógenos ováricos antes de la pubertad sobre el pulso generador de GnRH (Kinder et al., 1987). Pero conforme se acerca la pubertad este efecto disminuiría, convirtiéndose paulatinamente en un mecanismo de retroalimentación positiva provocando el aumento de las concentraciones circulantes de gonadotropinas, por incremento en amplitud y frecuencia de sus pulsos periódicos (Hafez, 1996), necesarios para la maduración folicular y ovulación (Kinder, 1987 citado por Stevenson, 1997).

En bovinos la pubertad ocurre hacia los 12 meses de edad, en ovinos a los seis o siete meses (Hafez, 1996); tiempo que estaría influenciado por el efecto de la nutrición sobre la maduración sexual (Kinder et al, 1987; Schillo et al., 1992). Estudios señalan que la subnutrición sería un inhibidor de la secreción pulsátil de LH al reducir la secreción de

la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), secreción que estaría relacionada con la información del estado metabólico del animal (Schillo, 1992) que se sugiere sería brindado por la leptina al sistema nervioso central (Mantzoros, 2000). De este modo la leptina serviría como una señal para el inicio de la pubertad (Baldelli et al., 2002), al estar relacionada con la activación del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal cuando el nivel energético corporal en el animal es el adecuado para desempeñar una función reproductiva normal (Mantzoros, 2000; Moschos et al., 2002; Baldelli et al., 2002).

En las alpacas a partir de los 12 meses de edad, se puede mostrar actividad sexual seguida de ovulación y fertilización (Novoa et al., 1972), donde el inicio de la pubertad se relaciona más estrechamente con el peso corporal, por lo que se recomienda un peso no menor a 36 kg para obtener tasas de natalidad similares a las de adultos (Sumar, 1983). En alpacas de un año de edad con menos de 33 kg de peso corporal al momento de empadre, Leyva y Sumar (1981), encontraron que el peso al nacimiento de sus crías era significativamente menor que las de aquellas con más de 38 kg; así mismo que por cada kilogramo de incremento de peso corporal hubo 5% de incremento en el porcentaje de natalidad.

2.1.2. Comportamiento sexual

La hembra camélida en estado de receptividad sexual, al ser requerida por el macho se deja montar y adopta una posición decúbito ventral aceptando la cópula, a veces algunas intentan escapar pero luego de varios intentos del macho lo aceptan, mientras otras se acercan a una pareja en cópula, huelen al macho y se echan a su lado (Fernández Baca, 1971; Novoa, 1991; Sumar, 1997). La hembra asume una actitud muy pasiva durante la cópula (Sumar, 1997) y raramente ocurren montas entre hembras, similares a las que se efectúa con el macho (Fernández Baca, 1971).

La alpaca no muestra ciclos estruales (San Martín et al., 1968), permanece en estado de receptividad constante en ausencia de macho, o con períodos cortos de exposición a él, y puede aceptar la cópula hasta por 40 días, con períodos de no receptividad no mayores de 2 días (Novoa, 1989); la constancia probablemente se debería a ondas foliculares continuas de larga duración con presencia aparentemente continua de un

folículo estrogénico y su consiguiente secreción de estrógenos (Novoa, 1989; Fernández Baca, 1993).

La duración de la cópula es variable, en empadre libre se registra $8,1 \pm 5,4$ minutos y en empadre controlado $17,5 \pm 12,1$ minutos (Novoa, 1991); a veces se prolonga por más de 50 minutos (Fernández Baca, 1971).

La receptividad sexual en alpacas parecería estar en relación con el grado de desarrollo de los folículos (Fernández Baca, 1971). La inexperiencia sexual de la hembra también afecta el comportamiento de receptividad (Pollard et al., 1995) y las hembras no receptivas escapan del macho, escupen y patean (England et al., 1971, citado por Sumar, 1997; Pollard et al., 1994).

La no receptividad es una característica diferencial entre hembras preñadas y vacías; puesto que se considera que dentro de los 18 a 20 días posteriores a la monta, cuando la receptividad no está presente es debido a la preñez (Fernández-Baca, 1971), por el efecto inhibitorio de la progesterona. En relación a la efectividad de determinar preñez en llamas mediante conducta sexual a los 16 días post servicio, ésta fue de 76,2% al compararla con el diagnóstico ecográfico a los 17 días post servicio (Cárdenas et al., 2001).

Sumar et al (1972) encontraron que a los cuatro primeros días posteriores al parto las hembras pueden ser receptivas al macho y copular, sin embargo la fertilización se logró sólo a partir de los 5 días en un 30%, mientras que a los 10 días en un 70%. Así mismo, el porcentaje de ovulación fue mayor en hembras con un período postparto ≥ 20 días (Bravo et al., 1995a). La involución uterina completa fue observada en un 63% de hembras a los 21 días postparto (Bravo et al., 1995b).

2.1.3. Ovulación

Los camélidos son especies de ovulación inducida por la cópula, su estímulo proporciona el impulso nervioso necesario para desencadenar la secreción hipofisaria de la hormona luteinizante (LH), responsable de causar la ruptura folicular y la consiguiente liberación del óvulo (Fernández Baca, 1971). Estudios en bovinos señalan

que previo al proceso de ovulación ocurre disociación y descomposición progresiva de diversas capas celulares que rodean el ápice del folículo preovulatorio como resultado de las actividades de enzimas proteolíticas producidas por las células de la granulosa, por fibroblastos circulantes o por ambos en respuesta a LH, progesterona (P4) y prostaglandina (Hafez, 1996); debido a que cuando la ovulación es inminente, se produce un incremento progresivo de las células apoptósicas, en la superficie epitelial del ovario, túnica albugínea, y pared apical del folículo (Murdoch, 1995).

La ovulación puede ocurrir 26 a 30 horas después de la cópula (San Martín et al., 1968; Adams et al., 1990) o puede ser inducida artificialmente entre las 24 – 30 horas postinyección de gonadotropina coriónica humana (hCG), de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de LH (Fernández Baca, 1971; Novoa, 1991; Sumar, 1997; Leyva y García, 1999a; Aller et al., 1999; Huanca et al., 2001).

La ocurrencia de ovulación en llamas se reporta independiente del tipo de monta (vasectomizados vs. intactos) o del estado de lactación (lactante vs. no lactante) (Adams et al., 1990); concordando con resultados de Bravo y Sumar (1985), en alpacas.

Ríos et al. (1985) dedujeron que el semen total de alpaca y toro aplicados intravaginalmente tienen un factor de inducción de ovulación en alpacas en receptividad sexual, señalándolo como un nuevo mecanismo de ovulación, aunque sus efectos sobre el sistema endocrino y fisiológico de la hembra alpaca o llama aún no se conocen.

Así mismo, se ha reportado un 5 a 10 % de ovulaciones espontáneas en alpacas que no fueron privadas totalmente de estímulos visuales, olfatorios y auditivos del macho (Sumar, 2000); o hasta un 42,86 % frente a la sola presencia del macho (Vivanco et al., 1985).

El incremento de las concentraciones de LH, ha sido observado quince minutos después de iniciada la cópula y a las 2 horas en el pico preovulatorio (3-8 ng/ml); volviendo a su nivel basal (0,96ng/ml) a las 7 horas; también se observó que dentro de las 24 horas, una segunda cópula no provoca una liberación significativa de LH (Bravo et al., 1992). Sin embargo, esto último contrastaría con los resultados obtenidos por Sumar y Alarcón (1989) en tasas de natalidad versus el número de servicios, ya que estas tasas fueron superiores en alpacas que recibieron dos servicios frente a las de un

solo servicio. Así mismo, se encontró que en alpacas que recibieron copulaciones adicionales en los días 3 y 4 post ovulación hubo una tendencia porcentual de mayor sobrevivencia embrionaria y de preñez (Aparicio, 2001).

La cópula es relativamente larga en los camélidos sudamericanos y con períodos variables (Sumar, 1997). Existen trabajos que refieren que a mayor tiempo de duración de la cópula se obtiene mayor porcentaje de alpacas que ovulan, sin embargo se ha encontrado que en varios casos hembras con más de 20 minutos no llegan a ovular mientras que otras con 5 minutos si lo hacen (Vivanco et al., 1985).

Existen fallas ovulatorias post cópula, que no han sido totalmente explicadas, señalándose que podría ser atribuida a una sensibilidad disminuida de los folículos a los niveles circulantes de LH debido a las variaciones en los estadios de maduración folicular (Fernández Baca, 1971; Novoa, 1989).

En un estudio se señala que hembras con folículos pequeños liberaron menores cantidades de LH (29.1 ng/ml/6h) comparados con aquellas con folículos mayores en maduración (55.1 a 62.4 ng/ml/6h) o en regresión (63.7 ng/ml/6h), y que no ocurrió ovulación en aquellas con folículos <7mm de diámetro al momento de la cópula (Bravo et al., 1991), esto último estaría relacionado con la adquisición de los receptores de LH a estados avanzados del desarrollo folicular (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

En bovinos se conoce que el balance energético negativo decrece la secreción pulsátil de LH, afectando el crecimiento folicular y la oportunidad de que se presente ovulación ya que no ocurre el pico preovulatorio de LH (Schillo, 1992).

Por otro lado, Bravo y Sumar (1985) señalan a la edad como un factor importante de falla de ovulación, llegando a ser de 74% en alpacas de un año de edad con pesos ≥ 35 kg frente a un 23 a 31 % en alpacas adultas.

Después de la ovulación se forma el cuerpo lúteo, indicado por su presencia se señala que la actividad ovulatoria es similar entre ovario derecho e izquierdo en llamas (Sumar y Leyva, 1979) y alpacas (Fernández Baca, 1971).

Ovulaciones múltiples, en la mayoría dobles, ocurren en un 10 % de alpacas después de la cópula (Fernández Baca, 1971) y en un 20 % después de la inyección de hCG

(Fernández-Baca, 1993), pero partos múltiples en raras ocasiones, siendo en llamas el nacimiento de mellizos más frecuente que en alpacas pero sin dejar de ser ocurrencias eventuales (Fowler, 1995, citado por Sumar, 1997).

2.1.4. Cuerpo Lúteo

Producida la ovulación, se da inicio a la organización estructural y funcional del cuerpo lúteo (CL) por acción de la LH; las células tecales se luteinizan para dar lugar a las células luteales pequeñas, además se produce la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa dando lugar a las células luteales grandes; ambas células luteales son responsables de secretar progesterona (P4) (Hafez, 1996).

El CL aumenta gradualmente de tamaño y actividad secretoria de P4, existiendo correlación entre sí (Fernández Baca, 1971); siguiéndose un patrón similar de P4 en llamas y alpacas, aunque para el día 4 las concentraciones sean significativamente más altas en las últimas (Aba et al., 1995).

En alpacas el CL alcanza su máximo diámetro (14mm) en los días 8-9 post cópula o post inyección de hCG, declinando marcadamente en ausencia de preñez para el día 12; la regresión completa se observa el día 18; así mismo, la concentración de progesterona es elevada en el día 8 ($4,41 \pm 0,36$ ng/ml), declinando hacia el día 18 a $0,23 \pm 0,04$ ng/ml; en alpacas preñadas ocurre un comportamiento similar hasta el día 8, pero se produce una declinación alrededor del día 13 y posteriormente los valores se recuperan entre el día 18 y 23 (Fernández Baca et al., 1970a; Aba et al., 1995).

En llamas, con el uso de ultrasonografía, se observó que el CL alcanza su máximo diámetro en los días 5,9 (13mm) y 21,4 (16mm) post ovulación en no preñadas y preñadas respectivamente; habiendo en ambas una caída de progesterona en el día 8 post ovulación, que se recupera después del día 10 en preñadas (Adams et al., 1991). Aba et al. (1995) señala que una disminución transitoria en las concentraciones de P4 fue observada en llamas y alpacas preñadas entre los días 8 y 18 post ovulación .

La caída momentánea de P4 representaría la iniciación de la regresión luteal inducida por el útero, donde se sugiere que la prostaglandina F₂á (PGF₂á) podría estar involucrada (Fernández Baca, 1993), pero que sería rescatada tanto por el embrión presente y en desarrollo (Sumar, 1997) quien produciría una señal para su reconocimiento maternal (Aba et al., 1995) y por la acción de un mecanismo antiluteolítico en los días 10 – 12 post monta que protegería al CL (Aba et al., 1997).

En alpacas y llamas no preñadas, un incremento de la secreción de PGF₂á se observó desde el día 9 al 12 post cópula alcanzando picos de valor alto; en animales preñados el incremento fue lento, pero el día 24 alcanzó valores considerablemente altos comparados con los registrados en el día 4 (Aba et al., 1995; Aba et al., 2000). Leyva y García (1999b) encontraron que la prostaglandina exógena afecta la vida del CL cuando se administra después del día 4 de la fase luteal inducida, sugiriendo que la PGF₂á es el agente luteolítico en camélidos.

El eje hipotalámico hipofisiario de la alpaca es sensible al efecto inhibitorio de la P4 y los días de receptividad sexual que normalmente presentan las alpacas después de la ovulación se sugiere sean porque los niveles de P4 secretados por el CL son aún insuficientes para ejercer el efecto inhibitorio (Leyva y García, 1999a).

Al día 5 post ovulación desaparece la conducta de receptividad al macho, continuando así durante la permanencia activa del CL; si no ocurre fertilización, el CL involuciona a partir del día 13 post ovulación, retornando la receptividad al macho (Fernández Baca, 1971).

2.2. Endocrinología y dinámica folicular

2.2.1. Eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal en la hembra

El control de la reproducción en la hembra está determinada por una compleja interacción entre hormonas hipotalámicas, hipofisiarias y gonadales. Estudios en bovinos y ovinos sugieren que la leptina estimularía la activación del eje, al servir como señal para el sistema nervioso cuando las reservas críticas de grasa sean adecuadas para la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas, (Mantzoros, 2000; Baldelli

et al., 2002). La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es secretada en forma pulsátil desde el hipotálamo, y desempeña un rol clave en los procesos reproductivos, actuando sobre receptores de membrana específicos situados en las células gonadotrofas de la hipófisis y de este modo controlar la síntesis y secreción de las gonadotropinas, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona Luteinizante (LH) responsables de estimular la esteroidogénesis y gametogénesis (Brooks y McNeilly, 1996). En las especies de ovulación inducida, como los camélidos, la estimulación coital provoca un reflejo neuro-endocrino que activa el centro de la GnRH, permitiendo una secreción pulsátil de LH (Arthur, 1991); sin embargo no se afecta la secreción de FSH (Bravo et al., 1991).

La FSH es una hormona esencial para el inicio del desarrollo y mantenimiento de los folículos ováricos en los mamíferos, en presencia de LH estimula la secreción de estrógeno por los ovarios; la LH estimula la producción de testosterona en la teca interna y la FSH estimula la aromatización de testosterona a estrógeno en las células granulosas del folículo (Hafez, 1996). El incremento de la concentración de estrógeno circulante tiene un efecto positivo sobre el hipotálamo, dando por resultado la secreción preovulatoria de LH y FSH (Hafez, 1996). El rol principal de ésta secreción de LH es la inducción de la ovulación, luego de la cual las células del folículo ovulatorio se luteinizan y empieza la secreción de P4, la cual tiene un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo, al prevenir la secreción de GnRH y desensibilizar a los gonadotrofos a la acción de la GnRH (Stevenson, 1997).

Cuando no ocurre fertilización, durante el período de actividad del CL, los estrógenos producidos por los folículos dominantes inducirán el aumento de receptores de Oxitocina en el útero, la Oxitocina estimulará la producción de PGF2á en el útero y se desencadenará la luteólisis (Leyva, 1996). La retroalimentación positiva de la cascada de Oxitocina desde el CL al útero y de la PGF2á desde el útero al CL probablemente sirve como un mecanismo que asegura la luteólisis. Producida la luteólisis los niveles de P4 declinan permitiendo el resurgimiento de los niveles de LH (Stevenson, 1997).

2.2.2. Dinámica folicular

Los mecanismos endocrinológico involucrados en el desarrollo folicular en camélidos sudamericanos no han sido estudiados en detalle, existiendo aún diversas interrogantes. Sin embargo se han realizado estudios sobre dinámica folicular en otras especies.

Así, estudios *in vitro* en roedores, indican que existen factores que participan en el incremento o disminución del número de folículos que dejan el pool inicial; mientras que en rumiantes se sugiere la participación de factores para la activación gradual de folículos; además los estudios señalan que habría un paso espontáneo facilitado del folículo primordial hacia folículo secundario y que dicha transición sería crítica para el desarrollo hacia folículo preantral y antral (Fortune, 2003). En ovinos se conoce que en los folículos preantrales hay receptores de LH y FSH específicamente en las células de la teca y granulosa respectivamente, que se incrementan significativamente cuando estos folículos se hacen antrales y alcanzan los 2 mm de diámetro; se sugiere que la FSH inicia el crecimiento de los folículos antrales (Leyva, 1996), efecto estimulante que está fundamentado en todas las especies (Greenwald et al., 1994).

El desarrollo de folículos antrales pequeños no es estrictamente dependiente de gonadotropinas, sino que los factores locales FGF (factor de crecimiento fibroblástico), EGF (factor de crecimiento epidérmico) y el IGF (factor de crecimiento semejante a insulina) tienen influencia directa en el desarrollo folicular al promover la proliferación de las células de la granulosa (Monniaux et al., 1997). Los factores de crecimiento serían activadores de receptores que promueven la sobrevivencia y proliferación, para contrarrestar los efectos de factores que inhiben el crecimiento de la célula y que bajo ciertas circunstancias promueven la apoptosis (Anderson, 1997). El IGF-I sería un inhibidor de la apoptosis de células de la granulosa en folículos antrales tempranos y preovulatorios (Chun et al. 1996), pero su efecto en el crecimiento de las células de la granulosa estaría reducido cuando está ligado al péptido IGFBP-3 que tiene un efecto antagonista a la FSH (Ling et al., 1993). Se sugiere que las gonadotropinas actuarían inhibiendo la apoptosis en las células de la granulosa al reducir la expresión de la IGFBPs e incrementar la expresión de la IGF-I (Hammond et al., 1991). El Factor de Crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) inhiben la

apoptosis de células de la granulosa en folículos preovulatorios (Tilly et al., 1992; Chun et al., 1996); y la activina lo hace en folículos antrales tempranos (Chun et al., 1996) previniendo la prematura luteinización y atresia (Leyva, 1996), cumpliendo un rol paracrino en el desarrollo folicular (Thomas et al., 2003). Así mismo, niveles elevados de óxido nítrico, cuya síntesis se ve incrementada con la producción de IL-1 que es estimulada por la LH, serían capaces de reducir la apoptosis en células de la granulosa en cerdos (Ponderato et al., 2000) y en bovinos (Basini et al., 1998).

La IGF1 cumple un rol fundamental en el reclutamiento y selección del folículo dominante, y favorece la aromatización inducida por la FSH en las células de la granulosa, de ahí el aumento paulatino de estradiol en el folículo dominante (Steinkampf et al., 1998). Al emerger el folículo dominante incrementa su producción de estradiol y de inhibina; que tiene como consecuencia, la maduración sostenida de dicho folículo y la restricción del crecimiento de otros folículos (Monniaux et al., 1997) al regularse la secreción de FSH por el sinergismo de ambas hormonas (Leyva, 1996). El desarrollo de folículos terminales es dependiente estrictamente de gonadotropinas, dado que su crecimiento está caracterizado por un fuerte incremento en la sensibilidad a la FSH por sus células de la granulosa (Monniaux et al., 1997) y a que cuando el folículo dominante alcanza el tamaño preovulatorio adquiere receptores de LH en la granulosa, probablemente por influencia del estradiol, permitiéndole sobrevivir al descenso de FSH que ocurre previo al pico preovulatorio de LH, que es potencial para la ovulación (Findlay, 1993; Leyva, 1996). En consecuencia, la integración de señales extraováricas y factores intrafoliculares serían los que determinan si un folículo continuará su desarrollo o seguirá el camino a la atresia (Webb et al., 2003); como ocurre con el folículo dominante quien puede sobrevivir al descenso de FSH por la acción temprana de factores locales como IGF-1, activina e inhibina, quienes sensibilizan sus células a la estimulación por gonadotropinas en sus etapas terminales; a diferencia de los folículos subordinados que parecen no desarrollar estos mecanismos de sobrevivencia por lo que se vuelven atrésicos (Findlay, 1993).

Estudios sugieren que la leptina regularía la foliculogénesis e influiría en la secreción de gonadotropinas (Brannian y Hansen, 2002); en cerdas se encontró una asociación entre niveles bajos de gonadotropinas y un pobre desarrollo folicular (Willis et al.; 1999); Brannian y Hansen (2002) señala la presencia de receptores de leptina en

las células del folículo, incluido el oocito, sugiriendo que el leptina podría cumplir un rol fisiológico directo en la maduración folicular y el desarrollo del oocito.

2.2.3. Dinámica folicular en camélidos sudamericanos

Las hembras camélicas no expuestas al macho, desarrollan ondas foliculares sucesivas, en tres fases de desarrollo, para lo cual un grupo de folículos son reclutados, de ellos es seleccionado uno e inicia su crecimiento, diferenciándose y alcanzando el tamaño ovulatorio (igual o mayor a 7mm de diámetro); mientras que los demás regresionan (Bravo et al., 1990; Fernández Baca, 1993; Brown, 2000).

Las tres fases o estadios descritos son: crecimiento, maduración y regresión (Bravo et al., 1990; Novoa, 1991). En el estadio estático o de maduración el folículo dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños (Bravo et al., 1990); reportándose una relación inversa entre el diámetro del folículo dominante y el número de folículos pequeños (Adams et al., 1990). En llamas preñadas, Adams (2001), reporta que el folículo dominante alcanza un menor diámetro ($9,7 \pm 0,2$ mm) que en no preñadas ($11,5 \pm 0,2$ mm) y anovulatorias ($12,1 \pm 0,4$ mm). Igualmente la lactación parece tener efecto, pues en llamas no lactantes el diámetro (12mm) es mayor que en las lactantes (10mm) (Bravo, 1997). El folículo dominante parece controlar su duración (Adams, 2001); puesto que si no hay ovulación se atresia; reconociéndose un nuevo folículo 2 a 3 días después de la primera disminución de tamaño del folículo dominante (Bravo et al., 1990).

Con respecto al largo de la onda folicular en camélidos sudamericanos, Bravo et al (1990) determinó un promedio total de 13,8 días; siendo para el estadio de crecimiento $4,8 \pm 1,5$ días; de maduración $5 \pm 1,6$ días y para el de regresión $4,0 \pm 1,1$ días; mientras que Adams et al (1990) determinó un largo total de 20 a 25 días; y Aba et al. (2000) estableció el largo de la onda en $22,6 \pm 2,5$ días; siendo la fase de crecimiento (desde 3 mm a su máximo diámetro) de $9,2 \pm 2,8$ días; maduración (permanencia alrededor del máximo diámetro) de $5,2 \pm 1,4$ días y regresión (diámetros decrecientes) de $8,2 \pm 2,2$ días; las diferencias encontradas se deberían al estado lactacional de los animales empleados (Adams, 2001).

El intervalo entre ondas foliculares, es decir el período entre la emergencia de folículos dominantes sucesivos, en promedio en alpacas es de $15,8 \pm 0,6$ días (Vaughan et al., 2000) y en llamas de $18 \pm 2,6$ días (Chaves et al., 2002) y se sugiere que la extensión de estos intervalos varía en relación al diámetro del folículo dominante; es decir, un menor intervalo estaría asociado con el menor diámetro del folículo.

El desarrollo de la onda folicular en alpacas se da de manera alterna en ambos ovarios, esto se comprueba con la presencia del folículo dominante en ambos ovarios en un 85 % (Fernández Baca, 1993); detectándose después de la ovulación el CL, en llamas, en el ovario derecho en 51 %, ovario izquierdo en 47 % y en ambos 2 % (Bravo et al., 1990; Sumar, 2000).

2.3. Gestación

2.3.1. Fertilización y gestación temprana

El transporte de espermatozoides hacia el sitio de fertilización (unión útero-tubal) en la alpaca es de manera gradual, el mayor número (82,7 %) se localiza en el istmo a las 18 horas post cópula; la unión útero-tubal parece ser además el principal reservorio de espermatozoides en la hembra (Bravo et al., 1996).

El desarrollo del embrión después de la fertilización en la alpaca es similar al de otras especies. El estadio de mórula de 4 a 6 blastómeros se observa en el oviducto alrededor del día 4 post cópula, como mórula compacta de gran número de blastómeros por el día 7 y en el útero como estadio de blastocisto por el día 10 (Bravo et al., 1996).

El conceptus (embrión y sus membranas) produce esteroides, prostaglandinas, proteínas y posiblemente otros agentes no identificados que pueden jugar un rol en el establecimiento y mantenimiento de la preñez, siendo la clave en este proceso la protección del CL de la acción luteolítica; es así que en el porcino, vacuno, ovino y equino se ha estudiado este mecanismo y ya se tienen precisiones al respecto (Bazer et al., 1986), sin embargo en camélidos sudamericanos aún se desconoce.

El Reconocimiento maternal de la preñez (RMP) en vacunos y ovinos involucra la producción por parte del conceptus de proteínas interferón tipo 1, que suprimen el

desarrollo de receptores de Oxitocina y la generación de episodios luteolíticos por la PGF2 α ; en vacas el RMP ocurre a partir del día 16 de gestación y en ovejas entre el día 12 y 22 (Bazer et al., 1986; Lamming et al., 1995). El RMP en la cerda ocurre entre los 11 a 16 días de gestación, involucra la producción por parte del conceptus de estrógeno que ejerce un efecto antiluteolítico resultando en el secuestro de la PGF2 α dentro del lumen uterino (Bazer et al., 1986).

En el camello (*Camelus dromedarius*), estudios en embriones de 8 a 22 días post ovulación, donde se incubaron membranas extra-embrionarias, indicaron que estos producían proteínas que diferían del interferón de ovinos o bovinos, mas si existía una alta actividad aromatasas con la producción de estradiol 17- β , sugiriendo que serían los estrógenos quienes provocan la señal para el mantenimiento de la función luteal (Skidmore et al., 1994). La producción de estrógeno por el embrión correspondería al reconocimiento maternal de la preñez (Skidmore et al., 1997).

En camélidos, con referencia a la implantación del embrión, se observó que casi en su totalidad se da en el cuerno uterino izquierdo, a pesar de no existir diferencia significativa en la actividad ovulatoria entre ambos ovarios; lo que indicaría que los embriones que se originan en el cuerno derecho tienen que migrar al lado izquierdo para su implantación (Fernández Baca et al., 1973; Sumar, 1997). Fernández Baca et al. (1975) mencionaron que en ausencia del cuerno uterino izquierdo, el derecho ofrece condiciones igualmente favorables para la sobrevivencia del embrión.

Si bien no se conoce exactamente las razones de la migración, una explicación al respecto estaría en la actividad luteolítica diferencial de ambos cuernos uterinos, al ser sólo local en el derecho y además sistémica en el izquierdo (Fernández Baca et al., 1979), por lo cual el embrión al implantarse en el cuerno izquierdo contrarrestaría su acción luteolítica (Fernández Baca, 1993). La implantación del embrión en las paredes uterinas parece ocurrir dentro de los 21 días que siguen al servicio (Fernández Baca, 1971).

Concentraciones de progesterona en alpaca se incrementan significativamente desde días previos a la cópula (0.11 ± 0.06 nmol/L) hasta los 30 días de preñez (8.05 ± 1.13 nmol/L) y permanecen altos hasta los dos meses de preñez; observándose una declinación transitoria entre los 3 a 7 meses. (Raggi et al., 1999).

Concentraciones de P4 mayores a 3,18 nmol/L (día 7, 21 y 40 post cópula) fueron detectadas en llamas empadradas con un período postparto \geq a 20 días en mayor proporción que en aquellas con período postparto de 10 días (Bravo et al., 1995a); siendo los porcentaje de preñez 61% y 21%, respectivamente (Bravo et al., 1994).

Aba et al.(1997) encontró que en alpacas preñadas las concentraciones de estradiol- 17β decrecen significativamente desde el día 8 hasta los días 10-11 post cópula, registrándose un incremento para el día 13; así mismo decrecen los niveles de P4 después del día 8, por ello valores registrados después del día 10 son más bajos que los del día 8; y que después del día 9 post cópula se detectan picos del metabolito de PGF 2α , señalando que indicaría la relación entre el descenso de P4 y la liberación pulsátil de PGF 2α , con lo que se sugeriría que ocurren picos de similar frecuencia pero de menor magnitud que los observados en alpacas no preñadas. Aba et al. (2000) señala similares resultados en llamas.

Un estudio preliminar de Sumar y García (1985) encontró que los niveles de P4 en la leche de alpacas preñadas llegan a 20,75 nmol/L el día 12 post cópula, mientras que en no preñadas a partir del día 11 se observa una caída hacia valores basales.

2.3.2. Mortalidad embrionaria temprana

La mortalidad embrionaria es un factor que reduce la eficiencia reproductiva en muchas especies domésticas, siendo esta pérdida embrionaria más altas en camélidos sudamericanos (Fernández Baca et al., 1970b).

Si bien los índices de fertilización verificados a los 3 días post servicio son altos, en más de 85%, los porcentajes de alpacas preñadas a los 30 días post servicio son mucho menores, con una pérdida embrionaria aproximada del 50% (Fernández Baca et al., 1970b; Fernández Baca, 1971).

La P4 secretada por el CL es necesaria para el mantenimiento de la preñez en la alpaca (Novoa, 1991; Sumar, 1997); se demostró que durante los 10 primeros meses el CL es indispensable para sostener la preñez (Novoa, 1991).

Una hipótesis planteada, no demostrada, por Sumar (1997), señala que si la cópula se produce en el estadio de crecimiento o regresión, se daría ovulación y fertilización, pero el CL no prosperaría más adelante quizá por la menor LH liberada, produciéndose

la mortalidad embrionaria temprana; pero estudios fisiológicos y endocrinológicos indicarían que en folículos en regresión, es decir en los atrésicos con un mayor contenido de testosterona no serían susceptibles a la ovulación (Hafez, 1996) tal como lo reportado por Bravo et al. (1991); en tanto si la cópula se da en el estadio de maduración, el CL tendría un adecuado funcionamiento. Con mayor liberación de LH, hay mejor estímulo en la hipófisis lo que reforzaría el establecimiento y desarrollo del CL para una eficiente secreción de P4 (Leyva y García, 1999c).

Sin embargo, la atresia folicular es una condición donde algunas de las células de la teca están muriendo mientras otras permanecen viables, y donde aún no se conoce cuando el oocito empieza a afectarse por los cambios atrésicos de las células que lo rodean, por lo cual a pesar de experimentar atresia los folículos mantienen su función, respondiendo a las gonadotropinas y secretan cantidades considerables de hormonas esteroideas (Zeuner et al., 2002); pero a medida que progresa la atresia se dan cambios significativos en el fluido folicular con respecto a folículos sanos (Rosales et al., 2000). Greenwald y Roy (1994) reportan que el oocito de folículos atrésicos es muy resistente a la degeneración tal es así que luego de ser cultivados por 74 horas con FSH, LH y estradiol y ser transferidos al oviducto en ovejas, por inseminación artificial desarrollaron a blastocisto en 46% de los casos.

Leyva y García (1999d) sugieren que alpacas receptoras con previa presencia de CL responden con eficiencia a la inducción de la ovulación y establecimiento de fertilización y gestación, debido quizás a una previa sensibilización de la P4 endógena sobre el eje hipotálamo-hipofisiario que resultaría en una mejor respuesta de secreción de hormonas gonadotrópicas sobre el establecimiento y desarrollo del CL de la preñez.

Leyva y García (2000) señalan que por efecto del estradiol (exógeno) probablemente sobre la función del CL magnifiquen las fallas en el establecimiento y/o viabilidad de la fertilización y subsecuentemente en la sobrevivencia embrionaria, sugiriendo que un efecto similar tendrían los folículos estrogénicos.

Entre los días 8 y 11 se produce un descenso de los niveles de P4 así como una reducción del diámetro del CL, lo que coincide con el inicio de la inducción uterina para la regresión del CL y también con el momento de reconocimiento maternal de la preñez, el cual también estaría involucrado con la mortalidad embrionaria (Sumar, 2000).

Huanca (1997) señala al desbalance nutricional como causa de mortalidad embrionaria; sin embargo no es considerada una causa determinante ni la principal en camélidos (Knight et al., 1995), aunque en bovinos se ha demostrado que la nutrición tiene un efecto directo en la calidad del oocito y en el desarrollo embrionario temprano debido a que influiría en la expresión de los patrones genéticos de los factores intrafolículos que participan en la maduración del oocito (Webb et al., 1999). Factores como agentes infecciosos (Fernández Baca, 1971), imbalances hormonales, factores inmunológicos, inadecuado ambiente uterino y aberraciones cromosómicas estarían comprometidos con la mortalidad embrionaria (Sumar, 1997). La flora bacteriana del tracto genital puede afectar la fertilidad, tal es así que en un 10-30% de hembras en edad reproductiva la metritis ejerce un factor negativo en la concepción, permitiendo obtener bajas tasas de preñez (Ludeña, 1979; Ludeña et al., 1979). En otras especies se viene recientemente implicando a la leptina en la regulación de la fertilidad (Baldelli et al., 2002), encontrándose que la deficiencia o ausencia de leptina estaría asociada con infertilidad (Smith et al., 2002)

2.3.3. Gestación media y avanzada

El período de gestación promedio en alpacas Huacaya y Suri es de 342 y 345 días respectivamente (San Martín et al., 1968); mientras que en llamas es de 350 días (León et al., 1990). Davis et al. (1997) mencionaron que en Nueva Zelanda el largo de gestación fue mayor en alpacas empadradas en primavera (Octubre-Diciembre) versus las de otoño (Febrero-Abril), difiriendo en 12,5 días.

Muerte fetal entre los 30 a 81 días de gestación fue reportada en Nueva Zelanda en un 17,8% de alpacas empadradas en otoño frente a un 2,8% de las empadradas en primavera, reflejando un efecto estacional; esta diferencia no fue significativa más allá de los 120 días de gestación (Knight et al., 1995).

En llamas concentraciones de P4 plasmática permanecieron elevadas (6,36 nmol/L) durante toda la preñez, pero dos semanas antes del parto empieza a declinar, cayendo marcadamente hasta niveles basales (1,59 nmol/L) a las 24 horas previas al parto (León et al., 1990). Raggi et al. (1999) encontró en alpacas resultados similares, dándose la caída marcada de P4 a las 72 horas antes del parto.

Las concentraciones más altas de 15-ketodihydro-PGF₂α en llamas y alpacas (159±35 nmol/L y 92±29 nmol/L respectivamente) fueron detectadas en el día del parto y las concentraciones basales en el día 3 postparto (Aba et al., 1998).

Concentraciones de estradiol 17-β fueron más elevadas de 180 pmol/L durante los últimos 45 días de preñez, empezando a decrecer en el día del parto y alcanzando muy bajas concentraciones los dos siguientes días; concentraciones altas fueron registradas 7 días postparto en alpacas y a los 10 días en llamas (Aba et al., 1998).

El sexo del feto pudo ser detectado a los 55 a 60 días de gestación, debido a la clara diferenciación de sus genitales externos (Fernández Baca, 1971; Bravo y Varela, 1993). El cuerpo se halló totalmente cubierto por fibra al día 240 de gestación. (Bravo y Varela, 1993).

2.5. Ultrasonografía en reproducción

A comparación de otras técnicas, como la laparoscopia o la laparotomía exploratoria, la ultrasonografía es una herramienta no invasiva, que es usada ampliamente para el examen repetido de ovarios y tracto reproductivo en muchas especies domésticas de importancia económica como el equino y el vacuno, y que fue introducida en camélidos sudamericanos hace poco más de una década, siendo bien tolerada y sin efectos adversos (Bourke et al., 1992).

Con la ultrasonografía transrectal se ha estudiado en camélidos sudamericanos eventos reproductivos tales como el desarrollo de los folículos ováricos, la ovulación, el desarrollo y regresión del CL, la preñez temprana y mortalidad embrionaria, entre otros (Bourke et al., 1992).

El estroma ovárico se ve ecogénico y más brillante que el resto de estructuras ováricas, los folículos ≥ 4 mm producen imágenes no ecogénicas (negras) redondeadas, fáciles de identificar (Sumar, 1989).

La ovulación se considera ocurrida cuando se da la desaparición del folículo preovulatorio previamente visualizado en el ovario y puede ser detectada en promedio a los 1.8 días después de una monta simple (Adams et al., 1989).

El cuerpo lúteo maduro de 11 a 13 mm en diámetro se observa como una estructura hipocogénica con un área central ecogénica horizontal (Adams et al., 1989). Sumar (1989) menciona que el CL de imagen similar a la descrita puede ser observable entre los 3-4 días post servicio.

En hembras no preñadas el útero se caracteriza por ser una estructura ecogénica densa y con un lumen no distinguible. A diferencia de las preñadas donde se distingue áreas no ecogénicas (Bourke et al., 1992) debido a la presencia de fluido en el lumen uterino, detectado a los 14 días en un 100 % de hembras (Sumar, 1989), distinguiéndose la vesícula embrionaria simple en el cuerno uterino izquierdo (Adams et al., 1989) alrededor del día 12 post monta en alpacas (Bravo y Mayta, 2000).

El embrión se detecta desde los 21 a 22 días de gestación (Bourke et al., 1992; Bravo y Mayta, 2000) y a los 30 días se aprecian los latidos cardíacos y el cordón umbilical, de ahí en adelante hasta los 45 días la cavidad uterina y embrión se detectan con mayor facilidad (Sumar, 1989). Parraguez et al. (1997) realizó un diagnóstico temprano de preñez tan pronto como a los 9 días post cópula en alpacas y a los 7 días en llamas.

La ultrasonografía es una técnica útil para determinar el estado reproductivo de las hembras en ausencia de signos de comportamiento característicos de receptividad sexual, por lo cual la actividad reproductiva en camélidos sudamericanos puede ser manipulada para optimizar la eficiencia reproductiva y para desarrollar procedimientos tecnológicos como superovulación y transferencia embrionaria (Bourke et al., 1992; Del Campo et al., 1995).

2.6. Aplicación de otras técnicas diagnósticas de gestación en camélidos

La detección de preñez mediante palpación rectal en alpacas puede ser tan pronto como a los 30 días de gestación, sin embargo es un método limitado por el tamaño pélvico y el estado de carnes del animal, especialmente en animales jóvenes. Se puede aplicar en un 70 % de jóvenes y un 90 % de alpacas adultas, y su precisión puede llegar al 100 % a los dos meses post monta (Alarcón et al., 1990) debido a que el útero en preñez es dos veces más grande que a los 30 días, y permanece en la cavidad pélvica

hasta los 3 meses de gestación; de ahí en adelante, el útero y su contenido descienden a la cavidad abdominal (Bravo y Varela, 1993).

En crianzas tradicionales del sur del Perú, la palpación externa o “balotaje” es un método con precisión cercana al 80 %, empleado aproximadamente a los 8 meses de gestación (Sumar, 2000), siendo entonces un método tardío para un eficiente manejo reproductivo (Sumar, 1997).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Lugar de estudio

El experimento se realizó en el Anexo Quimsachata de la Estación Experimental ILLPA-INIA, ubicado a 4200 msnm, entre los distritos de Santa Lucía y Cabanillas de las provincias de Lampa y San Román respectivamente, en el departamento de Puno, a 15°04' de latitud sur y a 70°18' de longitud oeste; durante los meses de Febrero-Marzo del año 2003.

3.2.- Animales

Se usaron 116 alpacas hembras adultas con historia de partos anteriores y con descanso postparto mayor ó igual a 15 días y con presencia de folículos (> 5 mm) detectados por ecografía transrectal ovárica. Todas las hembras seleccionadas recibieron las mismas condiciones de manejo y fueron alimentadas en pastura natural.

3.3.- Diseño experimental

Cumplido el período de descanso postparto, se realizaron evaluaciones diarias con un ecógrafo modelo ALOKA SSD 500 y con un transductor lineal de 7.5 MHz para determinar el estadio de desarrollo folicular (crecimiento, maduración o regresión) de los animales incluidos en el estudio. Los animales fueron asignados al azar de acuerdo con el estadio de desarrollo a uno de los siguientes grupos:

G1 (n = 27): folículo dominante en estadio de crecimiento (diámetro = 6 mm).

G2 (n = 30): folículo dominante en estadio de crecimiento (diámetro $\geq 7 \leq 12$ mm).

G3 (n = 30): folículo dominante en estadio estático (diámetro ≥ 7 mm)

G4 (n = 29): folículo dominante en estadio de regresión (diámetro ≥ 7 mm).

Una vez asignadas a uno de los tratamientos, las alpacas fueron sometidas a empadre controlado dirigido con machos del plantel de reproductores, considerándose como válido un tiempo de cópula igual o mayor a 15 minutos.

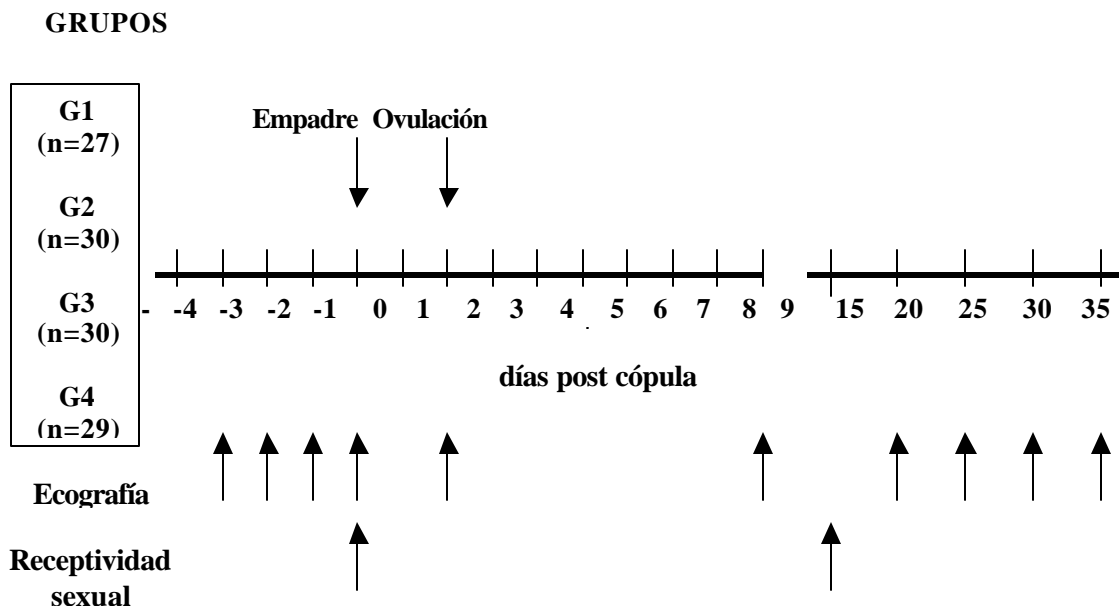
3.4. Procedimiento metodológico.

Los animales asignados para los grupos G1 y G2 fueron alpacas que presentaron un folículo dominante en crecimiento durante al menos tres días consecutivos de evaluación hasta que en el último día alcanzaron un diámetro ≥ 6 mm (G1) y $\geq 7 \leq 12$ mm (G2). Al grupo G3 se asignaron alpacas que presentaron un folículo dominante con un diámetro ≥ 7 mm y se mantuvo sin variación al menos en tres días consecutivos. En el grupo G4 se incluyó alpacas sometidas a un mayor período de observación hasta observar que el folículo dominante pasara del estadio estático al estadio de regresión y tuviera un diámetro mínimo ≥ 7 mm.

El día del empadre fue considerado el día 0 y las evaluaciones ecográficas posteriores se realizaron en los días 2, 9, 20, 25, 30 y 35. El día 2 se confirmó la ocurrencia de ovulación en base al criterio de desaparición del folículo dominante; en el día 9 se determinó la presencia y tamaño del cuerpo lúteo y en los días 20, 25, 30, 35 se determinó la presencia de la vesícula embrionaria y/o embrión. Adicionalmente, en el día 15 post cópula se realizó la prueba de receptividad sexual, enfrentando a las hembras con un macho; clasificándolas como receptivas y posibles vacías a aquellas que adoptaron la posición de cópula; y como no receptivas y posibles preñadas a las que no aceptaron al macho (Fig 1).

Los datos fueron colocados en fichas de registro individual para cada uno de los grupos e incluye tamaño del folículo dominante a la monta, ovulación, tamaño del cuerpo lúteo y/o presencia de la vesícula embrionaria y embrión.

Fig 1. Diseño experimental



3.5. Análisis estadístico

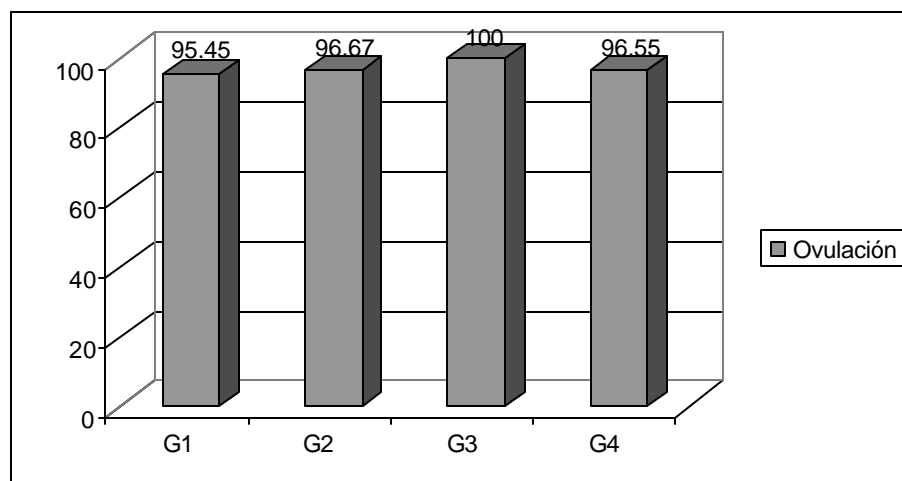
Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico STATA 8.0 (Statistical Analysis, 2003). La prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía fue utilizada para analizar la diferencia entre grupos con respecto a la media del tamaño del cuerpo lúteo al día 9 post cópula. La relación entre la tasa de ovulación con los grupos en estudio fueron evaluadas con la prueba de Chi Cuadrado (X^2). La sobrevivencia embrionaria en los diferentes días de observación y final fue analizada mediante curvas de supervivencia, estimadas y graficadas por el método de Kaplan Meier. Para la comparación de sobrevivencia final entre grupos (es decir, si estos son diferentes significativamente en términos de supervivencia) se utilizó la prueba de Log-Rank. El nivel de significancia empleado para el análisis de los resultados fue de $p < 0.05$

IV.- RESULTADOS

4.1. TASA DE OVULACIÓN

El 97,3% de los alpacas que fueron empadradas (n = 111) presentaron ovulación al día 2 post cópula, con formación de cuerpo lúteo al día 9. Se encontró 100% de ovulación en alpacas (n = 30) del grupo G 3; en los demás grupos las tasas de ovulación fueron G1=95.45%, G2=96.67 y G4=96.555%, sin diferencia significativa entre los 4 grupos en estudio. (Fig. 2)

Fig. 2.- Tasa de ovulación en el día 2 post cópula



G1= crecimiento (= 6 mm) G3= estático
G2= crecimiento (7 mm) G4= regresión

4.2. TASA DE SOBREVIVENCIA EMBRIONARIA

La tasa de supervivencia embrionaria experimentó una progresiva disminución que continuó hasta el último día de observación (Fig 3). No se encontró diferencia significativa entre los grupos en estudio (Cuadro 1), aún cuando al día 35 post cópula se registra una tendencia a una mayor tasa de supervivencia para el grupo G2 (65,52%) en comparación con los grupos G1 (52,38 %), G3 (53,33 %) y G4 (42,86 %). (Fig 4)

Fig. 3. Curva de supervivencia de Kaplan Meier para el período de observación

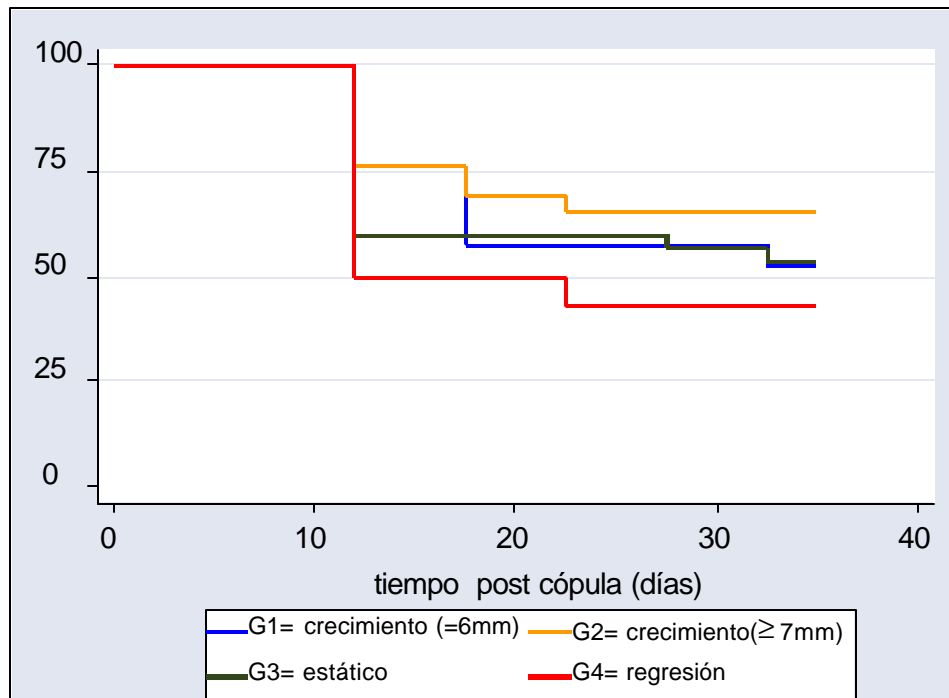
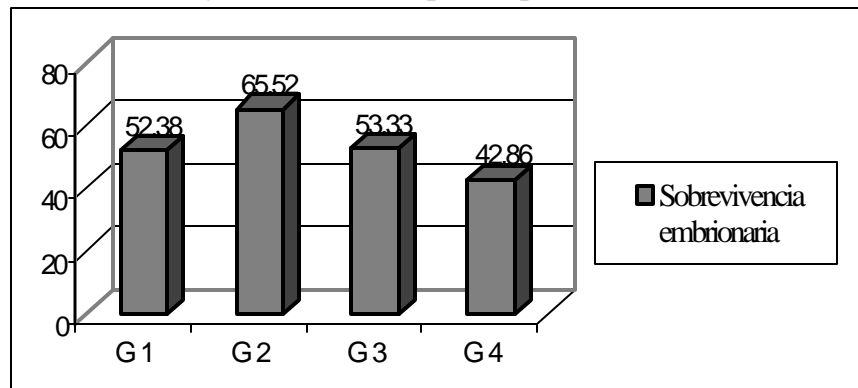


Fig. 4.- Tasa de supervivencia embrionaria en los 4 grupos en estudio (G1, G2, G3 y G4) en el día 35 post cópula



Cuadro 1. Tasa de sobrevivencia embrionaria en alpacas con folículo en fase de crecimiento (G1 y G2), fase estática (G3) y en fase de regresión (G4) al momento de la monta.

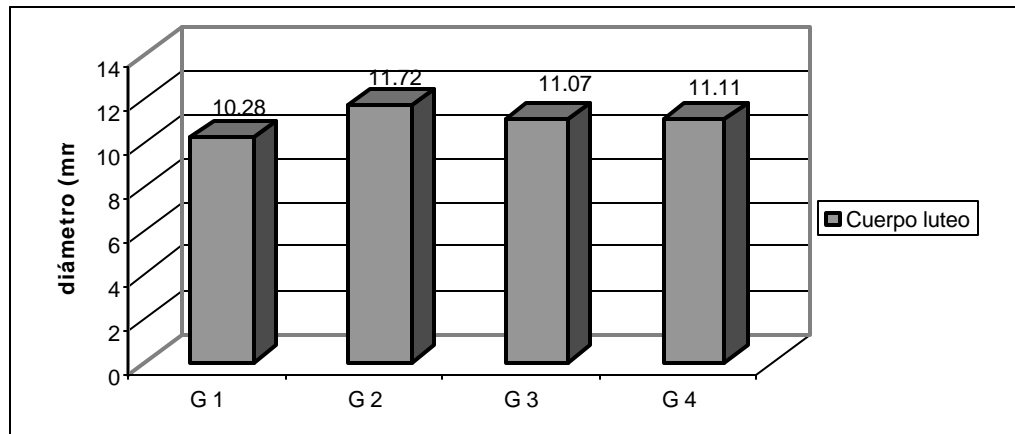
Grupos	G1	G2	G3	G4	Total
n	27	30	30	29	116
Alpacas empadradas	22	30	30	29	111
% Ovulación(n)	95.45(21)	96.67(29)	100(30)	96.55(28)	97.3(108)
Tasa de Sobrevivencia embrionaria (%)					
Día 15 post cópula *	66.67	72.41	60.00	50.00	62.27
Día 20 post cópula	57.14	68.97	60.00	50.00	59.03
Día 25 post cópula	57.14	65.52	60.00	42.86	56.38
Día 30 post cópula	57.14	65.52	56.67	42.86	55.55
Día 35 post cópula	52.38	65.52	53.33	42.86	53.52

*: receptividad sexual

4.3. TAMAÑO DEL CUERPO LÚTEO EL DÍA 9 POST CÓPULA.

En el día 9 post cópula, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño promedio del cuerpo lúteo entre los 4 grupos en estudio. Siendo para G1 = 10.28 ± 1.74 mm, G3= 11.07 ± 1.96 mm, G4 = 11.11 ± 2.23 mm y ligeramente mayor en el grupo G2= 11.72 ± 1.73 mm. (Fig. 5)

Fig. 5.- Tamaño promedio del cuerpo lúteo en el día 9 post cópula.



G1= crecimiento (= 6 mm) G3= estático
 G2= crecimiento (7 mm) G4= regresión

4.4. RECEPTIVIDAD SEXUAL

El día del empadre, 5 alpacas todas del grupo G1, no mostraron receptividad sexual al macho por lo que no fueron empadradas, mientras que las restantes presentaron receptividad (G1= 22; G2 = 30; G3 = 30; G4 = 29) y fueron empadradas (Cuadro 1).

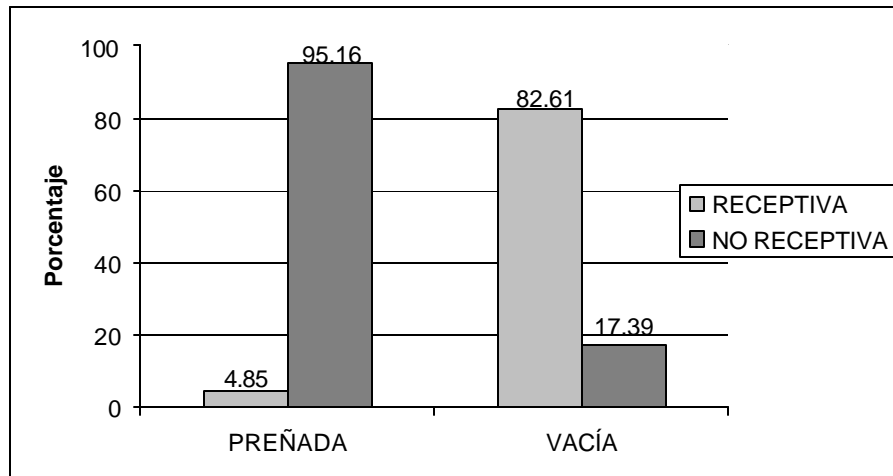
El comportamiento de receptividad sexual en el día 15 post cópula en relación a los resultados ecográficos al día 20 post cópula en alpacas que ovularon (n = 108), se aprecia en el Cuadro 2. Se observa una asociación marcada de la no receptividad (95.16%) al macho con la condición de preñez de la hembra, así como de la receptividad (82,61 %) al macho con la condición de vacía. (Fig. 6)

Cuadro 2. Receptividad sexual al día 15 post cópula en relación a la condición de preñez al día 20 post cópula.

	Preñadas*		Vacías*		TOTAL
	Receptiva	No recep.	Receptiva	No recep.	
TOTAL (n)	3	59	38	8	108

*: Determinada por ecografía.

Fig. 6.- Porcentaje de receptividad sexual al día 15 post cópula en relación a la condición de preñez al día 20 post cópula



V.- DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio sugieren que las tasas de ovulación y sobrevivencia embrionaria no estarían afectadas por el estadio del desarrollo folicular al momento de la monta en alpacas.

Sin embargo, los mismos indican que alpacas del grupo G2, quienes tenían folículo dominante promedio de $8,67 \pm 1,49$ mm en fase de crecimiento al momento de la cópula, tuvieron una mayor tasa de sobrevivencia embrionaria (65%) al día 35 post cópula comparados con los demás grupos en estudio. Esto podría explicarse considerando la duración total del estadio de crecimiento señalada por Bravo et al. (1990) de $4,8 \pm 1,5$ días, los folículos aparentemente se hallarían en una etapa avanzada del mismo y considerando que la ovulación se produce aproximadamente a las 26 horas post cópula (San Martín et al., 1968), esto facilitaría el crecimiento de folículo dominante hacia estadio estático, momento de mejor respuesta para el establecimiento y mantenimiento del cuerpo lúteo según lo señala Sumar (1997).

Bravo et al. (1991) señalan que hembras con folículos en crecimiento y estáticos (≥ 7 mm) presentarían ovulación e iniciarían su actividad luteolítica normal, así también que los folículos en maduración inducirían mayor liberación de LH como respuesta a la cópula. Con referencia a lo mencionado, el que nuestro estudio no haya encontrado la mejor respuesta en el grupo G3 (estático) en la tasa de sobrevivencia embrionaria (53.33%) a pesar de que este grupo fue el único que tuvo una tasa de ovulación del 100%, se debería a que varios de los folículos dominantes ($8,83 \pm 1,42$ mm) de este grupo, tomando en cuenta la duración total de estadio de maduración, $5 \pm 1,6$ días

(Bravo et al., 1990), se encontrarían en un estadio avanzado de maduración, con relativa proximidad al estadio de regresión.

Los resultados hallados en el grupo G4 (regresión) mostraron la presencia de ovulación seguido de fertilización contrastando con el trabajo realizado por Bravo et al (1991) quienes señalan que ocurre luteinización, mas no ovulación; esto quizás podría sugerir que el oocito de folículos atrésicos en alpacas sería resistente a la degeneración y con capacidad de fertilizar y desarrollar un embrión, similar a lo encontrado en ovejas por Greenwald y Roy (1994). Sin embargo, dependiendo del grado de alteración de la calidad del folículo dominante, a pesar de que no estar afectada significativamente su habilidad ovulatoria, habría una reducción en los subsecuentes porcentajes de preñez (Mihm et al., 1999); lo que concordaría con nuestros resultados ya que se halló una tasa de ovulación de 96.55 % y la menor tasa de sobrevivencia embrionaria (42,86%).

Así mismo la ocurrencia de ovulación en alpacas del grupo G1 a excepción de un solo animal, estaría explicado por los cambios en la estructura folicular del folículo dominante y por la actividad proliferativa que ocurre en el intervalo entre el pico de LH y la ovulación (Gore-Langton y Armstrong, 1994), que es sugerida a las 26 horas después de la cópula (San Martín et al., 1968); adquiriendo la capacidad ovulatoria por el incremento de la expresión de receptores de LH en las células de la granulosa (Sartori et al., 2001) Por otro lado, la falla ovulatoria post cópula concordaría con resultados hallados por Bravo et al. (1991) que sugirieron la no ocurrencia de ovulación de folículos menores de 7mm de diámetro al momento de la cópula, debido posiblemente a la inadecuada adquisición de receptores de LH ya que estos se incrementarían a medida que progresa el estadio folicular (Gore-Langton y Armstrong, 1994) o a lo sostenido por Bravo et al. (1991) quien señala que folículos pequeños liberarían menores cantidades de LH como respuesta a la cópula.

Es importante mencionar que el 100% de las alpacas que ovularon (108) manifestaron la formación del cuerpo lúteo, considerado por algunos autores como expresión de gestación temprana, debido a que Fernández Baca et al. (1970b) sustentó en sus estudios que las tasas de fertilización en los primeros días posteriores a la monta eran superiores al 85%.

El tamaño promedio del cuerpo lúteo para todos los grupos en estudio, fue similar y no presentó diferencia significativa al día 9 post cópula, día en el cual alcanzaría el máximo desarrollo según lo señala Fernández Baca et al. (1970a). Estos resultados sugieren que tras la monta, la formación del cuerpo lúteo sería independiente del estadio del folículo del cual proviene, pero que probablemente su mantenimiento si estaría influenciado por el mismo, lo cual explicaría la variación encontrada en las tasas de sobrevivencia embrionaria entre los grupos en estudio.

La receptividad sexual al macho en el día de la monta fue 100% en alpacas de los grupos G2, G3 y G4, así como 92,54 % en alpacas del grupo G1, apoyando lo señalado por Bravo et al. (1991) y Sumar (1997) con respecto a la aceptación al macho en cualquiera de los estadios foliculares por parte de las hembras camélidas. Por otro lado la no aceptación al macho en alpacas del grupo G1 podría explicarse por la poca habilidad de secretar cantidades significativas de estrógenos de sus folículos pequeños, según lo señalado por Gore-Langton y Armstrong (1994).

La receptividad sexual al macho en el día 15 post cópula, presente en hembras preñadas en el presente estudio, también fue reportado por Aparicio (2001); este comportamiento podría ser el resultado de la dominancia ejercida por el macho sobre la hembra o del acondicionamiento de las alpacas hembras al manejo reproductivo del centro experimental donde se realizó el estudio. Arainga (2001) lo atribuye a una posible falla en la interpretación del comportamiento sexual; mientras que Cárdenas et al. (2001) sugiere que esto se puede explicar por posibles deficiencias en la producción de progesterona atribuido a la calidad del cuerpo lúteo, que posiblemente llevan a una pérdida embrionaria posterior.

Esta información es importante para un mejor conocimiento de las condiciones fisiológicas normales involucradas en la sobrevivencia embrionaria, sin embargo aún se requiere de otros estudios que sustenten dichos resultados.

VI.- CONCLUSIONES

- La tasa de ovulación fue superior al 95%, independientemente del estadio de desarrollo folicular al momento de la monta en alpacas.
- El estadio del desarrollo folicular no tendría efecto significativo sobre la tasa de sobrevivencia embrionaria en alpacas.
- Alpacas con foliculo dominante en estadio de crecimiento ≥ 7 mm al momento de la monta, presentaron la mayor tasa de sobrevivencia embrionaria (65.52%) y las alpacas con foliculo dominante en estadio de regresión, la menor sobrevivencia embrionaria (42.86%).

VII.- BIBLIOGRAFÍA

Aba, M.; Forsberg, M.; Kindahl, H.; Sumar, J.; Edqvist, L. 1995. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet Scand.* 36 (4):489-498.

Aba, M.; Bravo, P.; Forsberg, M.; Kindahl, H. 1997. Endocrine changes during early pregnancy in the Alpaca. *Anim Reprod Sci.* 47(4):273-279

Aba, M.; Sumar, J.; Kindahl, H.; Forsberg, M.; Edqvist, L. 1998. Plasma concentrations of 15-ketodihydro-PGF₂α, progesterone, oestrone sulphate, oestradiol-17β and cortisol during late gestation, parturition and the early postpartum period in llamas and alpacas. *Anim Reprod Sci.* 50:111-121.

Aba, M.; Kindahl, H.; Forsberg, M.; Quiroga, M.; Auza, N. 2000. Levels of progesterone and changes in prostaglandin F₂α release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Anim Reprod Sci.* 59:87-97.

Adams, G. 2001. Comparative Aspects of Follicular Dynamics in Camelids. In: *Rev Inv Vet. Perú.* Suplemento 1. XXIV Reunión Científica APPA. Lima. p. 142-146.

Adams, G.; Griffin, P.; Ginther, O. 1989. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biol Reprod.* 41(3):551-558.

Adams, G.; Sumar, J.; Ginther, O. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J Reprod Fertil.* 90: 535-545.

Adams, G., Sumar, J.; Ginther, O. 1991. Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim Reprod Sci.* 24:127-138.

Aller, J.; Cancino, A.; Rebuffi, G.; Alberio, R. 1999. Inducción de la ovulación en llamas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. Cusco. p. 91.

Anderson, P. 1997. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(1):33-46

Aparicio, M. 2001. Efecto de la frecuencia de copulación en alpacas durante el celo postovulatorio sobre la mortalidad embrionaria. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. UNMSM. Lima. 44 pp.

Araínga, M. 2002. Estudio del efecto de la GnRH en el proceso de reconocimiento maternal de la preñez sobre la sobrevivencia embrionaria en alpacas (*Lama pacos*). Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. UNMSM. Lima. 51 pp.

Arthur, G. 1991. Reproducción y obstetricia veterinaria. 1ª edición. Editorial Interamericana. p 6-8.

Baldelli, R.; Dieguez, C.; Casanueva, F. 2002 The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Ann Med.* 34(1):5-18

Basini, G.; Baratta, M.; Ponderato, N.; Bussolati, S.; Tamanini, C. 1998. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reprod. Fertil. Dev.* 10:471-478.

Bazer, F.; Vallet, J.; Roberts, R.; Sharp, D.; Thatcher, W. 1986. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *J Reprod Fertil.* 76(2):841-850.

Bourke, D.; Adam, C.; Kyle, C. 1992. Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Vet Rec.* 130:424-428.

Brannian, J.; Hansen, K. 2002. Leptin and ovarian folliculogenesis: implications for ovulation induction and ART outcomes. *Semin Reprod Med.* 20(2):103-12

Bravo, P.W. 1997. Ovarian function in domesticated south american camelids. En: *Current therapy in large animal. Theriogenology.* Edit by Younquist, R. Vol II. Saunders Company Philadelphia. p. 803-806.

Bravo, P.W.; Sumar, J. 1985. Factores que determinan fertilidad en alpacas. En: *V Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Libro de Resúmenes.* Cusco, Perú. p. 4.

Bravo, P.W.; M. Fowler; G. Stabenfeldt.; Lasley, B. 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol Reprod.* 43:579-585.

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.

- Bravo, P.W.; Stanbenfeldt, G.; Fowler, M.; Lasley, B.** 1992. Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotropin-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biol Reprod.* 47:884-888.
- Bravo, P.W.; Varela, M.** 1993. Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). *Anim Reprod Sci.* 32:245-252.
- Bravo, P.W.; Fowler, M.; Lasley, B.** 1994. The Postpartum Llama: Fertility after parturition. *Biol Reprod.* 51:1084-1087.
- Bravo, P.W.; Pezo, D.; Alarcón, V.** 1995a. Evaluation of early reproductive performance in the postpartum alpaca by progesterone concentrations. *Anim Repro Sci.* 39:71-77.
- Bravo, P.W.; Lasley, B.; Fowler, M.** 1995b. Resumption of ovarian follicular activity and uterine involution in the postpartum llama. *Theriogenology.* 44:783-791.
- Bravo, P.W.; Moscoso, J.; Ordóñez, C.; Alarcón, V.** 1996. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Anim Reprod Sci.* 43:173-179.
- Bravo, P.W.; Mayta, M.** 2000. Growth of the conceptus in alpacas. *Amer J Vet Res* 61(12):1508-1511
- Brooks, J.; McNeilly, A.** 1996. Regulation of gonadotrophin-releasing hormone receptor expression in the ewe. *Anim Reprod Sci.* 42:89-98.
- Brown, B.** 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci.* 58: 169-195.
- Cárdenas, O.; Ratto, M.; Cordero, A.; Huanca, W.** 2001. Determinación de la fertilidad en llamas con un servicio, mediante conducta sexual y ecografía. *Rev Inv Vet. Perú. Supl 1:*467-469.
- Chaves, M.G.; Aba, M.; Agüero, A.; Egey, J.; Berestín, 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(1-2): 37-46
- Chun, S.; Eisenhauer, K.; Minami, S.; Billig, H.; Perlas, E.; Hsueh, A.** 1996. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology.* 137:1447-1456
- Davis, G.; Dodds, K.; Moore, G.; Bruce, G.** 1997. Seasonal effects on gestation length and birth weight in alpacas. *Anim Reprod Sci.* 46:297-303.

- Del Campo, M.; Del Campo, D.; Adams, G.; Mapletof, R.** 1995. The application of new technologies to South American Camelids. *Theriogenology*. 43:21-30.
- Fernández Baca, S.** 1971. La Alpaca. Reproducción y crianza. Boletín N° 7. IVITA. Fac. Nac. Mayor de San Marcos. Lima. 43 pp.
- Fernández Baca, S.** 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Anim Reprod Sci*. 33:307-323.
- Fernández Baca S., Hansel W.; Novoa C.** 1970a. Corpus luteum function in the alpaca. *Biol Reprod*. 3:252-261.
- Fernández Baca, S.; Hansel, W; Novoa, C.** 1970b. Embryonic mortality in the Alpaca. *Biol Reprod*. 3(2):243-251.
- 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. *Rev. Inv. Pec. IVITA. UNMSM*. 2(2):131-135.
- Fernández Baca, S.; Sumar, J.; Novoa, C.** 1975. Actividad funcional del ovario y cuerno uterino en la alpaca. An. V Reunión A.L.P.A. Venezuela. En: Resúmenes de Proyectos de Investigación realizados por la UNMSM (1975-1979). Tomo II. p.99.
- Fernández Baca, S.; Hansel, W.; Saatman, R.; Sumar, J.; Novoa, C.** 1979. Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. *Biol Reprod*. 20:586-595.
- Fortune, J.** 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*. 78:135-163
- Findlay, J.** 1993. An update on the roles of Inhibin, Activin and Follistatin as local regulators of Folliculogenesis. *Biol Reprod*. 48:15-23.
- Gore-Langton, R.; Armstrong, D.** 1994. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of reproduction*. 2nd ed. Edit. Knobil and J. Nelly. Raven Press. New York. Chapter 11. p. 571-628.
- Greenwald, G.; Roy, S.** 1994. Follicular development and its control. In: *The Physiology of reproduction*. 2nd edition. Edit. Knobil and J. Nelly. Raven Press. New York. Chapter 11. p. 650
- Hafez, E.** 1996. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6ta ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. 525 pp.

- Hammond, J.; Mondschein J.; Samaras, S.; Canning, S.** 1991. The ovarian insulin-like growth factors, a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 40(1-3):411-6.
- Huanca, W.** 1997. Nutrición y Reproducción. En: I Symposium Internacional: Avances en reproducción de rumiantes. Memorias. Lima. p. 74.
- Huanca, W.; Cárdenas, O.; Olazábal, C.; Ratto, M.; Adams, G.** 2001. Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Rev Inv Vet. Perú. Supl 1:*462-463.
- Kinder, J.; Day, M.; Kittok, R.**1987. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *J Reprod Fertil Suppl.* 34:167-86
- Knight, T.; Ridland, M.; Scott, I.; Death, A.; Wyeth, T.** 1995. Foetal mortality at different stages of gestation in alpacas (*Lama pacos*) and the associated changes in progesterone concentrations. *Anim Reprod Sci.* 40:89-97.
- Lammnig, G.; Wathes, D.; Flint, A.; Payne, J.; Stevenson, K.; Vallet, J.** 1995. Local action of trophoblast interferon in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. *J Reprod Fertil.* 105(1):165-175.
- León, J.; Smith B.; Timm, K.; 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.
- Leyva, V.** 1996. Follicular activity and ovulation of ewes during the breeding season and anestrus. Tesis PhD. Univ. Guelph, Canada.
- Leyva,V.; Sumar, J.** 1981. Evaluación del peso corporal al empadre sobre la capacidad reproductiva de hembras alpacas de un año de edad. En: Resúmenes de Proyectos de Investigación realizados por la UNMSM (1980-1981). Tomo III. p.39.
- 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. p. 87. Cusco, Perú.
- 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. p. 88.
- Leyva,V.; García, W.** 1999c. Efecto de la GnRH sobre la fertilización y sobrevivencia embrionaria en alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. Cusco. p. 90.

Leyva, V ; García, W. 1999d. Efecto de la Progesterona exógena y endógena en alpacas en celo sobre la ovulación, fertilización y gestación. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Resumen. Cusco. p. 89.

Leyva, V.; García, W. 2000. Efecto del estradiol (E2) en la fertilización y sobrevivencia embrionaria en alpacas. En: XV Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Resumen. Cusco. 22-23.

Ling, N.; Liu, X.; Malkowski, L.; Gua, Y.; Erickson, G.; Shimasaki, S. 1993 Structural and functional studies of the insulin-like growth factor binding proteins in the ovary. *Growth Regul* 3:70–74

Ludeña, H. 1979. Influencia de la flora bacteriana cuantitativa vaginal sobre la fertilidad en alpacas. En: Libro de Res. de proyectos de investigación realizados por UNMSM (1975-1979) Tomo II. p.240.

Ludeña, H.; Barsallo, J.; Leyva, V. 1979. Incidencia de infecciones genitales en alpacas. En: Libro de Res. de proyectos de investigación realizados por UNMSM (1975-1979) Tomo II. p.241.

Mantzoros, C. 2000. Role of leptin in reproduction. *Ann N Y Acad Sci.* 900:174-183.

Mihm, M.; Curran, N.; Hyttel, P.; Knight, P.; Boly, M.; Roche, J. 1999. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *J Reprod Fertil.* 116(2):293-304.

Monniaux, D.; Monget P.; Besnard C.; Huet C.; Pisselet C. 1997. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology.* 47: 3-12.

Moschos, S.; Chan, J.; Mantzoros, C. 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril.* 77(3):433-44.

Murdoch, W. 1995. Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod.* 53(1):8-12

Novoa C., Fernández-Baca S., Sumar J.; Leyva V. 1972. Pubertad en la alpaca. *Rev. Inv. Pec. IVITA. UNMSM.* 1:29-35.

Novoa, C. 1989. Reproducción. In: Simposio de producción de alpacas y llamas. XII Reunión Científica Anual. APPA. Perú. p. 67-72.

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. p. 93-103.

- Novoa, C.** 1992. Reproducción de Camélidos. Lima-Perú. MV Rev Cien Vet 8(4):9-11.
- Parraguez, V.; Cortéz, S; Gazitúa, G.; MacNiven, V.; Raggi, L.** 1997. Early pregnancy diagnosis in alpaca (*Lama pacos*) and llama (*Lama glama*) by ultrasound. Anim Reprod Sci. 47:113-121.
- Pollard J., Littlejohn R.; Scott, I.** 1994. The effects of mating on the sexual receptivity of female alpacas. Anim Reprod Sci. 34:289-297.
- Pollard J., Littlejohn, R.; Moore, G.** 1995. Seasonal and other factors affecting the sexual behaviour of alpacas. Anim Reprod Sci. 37:349-356.
- Ponderato, N.; Grasselli, F.; Saleri, R.; Tamanini, C.** 2000. Factors modulating apoptosis: An in-vitro study in swine granulosa cells. Reproduction in Domestic Animals. 35(5): 213
- Raggi, L.; Ferrando, G.; Parraguez, V.; MacNiven, V.; Urquieta, B.** 1999. Plasma progesterone in alpaca (*Lama pacos*) during pregnancy, parturition and early postpartum. Anim Reprod Sci. 54:245-249.
- Ríos M., Sumar J.; Alarcón V.** 1985. Presencia de un factor de inducción de la ovulación en el semen de alpaca y toro. Resum VIII Reunión Cient Anu Asoc Peruana Prod Anim. Perú. Huancayo. p. C-27
- Rosales, A.; Avalos, A.; Vergara, M.; Hernández, O.; Ballesteros, L.; García, R.; Ortíz, V.; Rosado, A.** 2000. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: Histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. Mol Reprod Dev. 55(3):270-281.
- 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.
- Sartori, R.; Fricke, P.; Ferreira, J; Ginther, O.; Wiltbank, M.** 2001 Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. Biol Reprod. 65(5):1403–1409.
- Schillo, K.** 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. J Anim Sci. 70:1271.
- Schillo, K.; Hall, J.; Hileman, S.** 1992.. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. J Anim Sci. 70(12):3994-4005
- Smith, G.; Jackson, L.; Foster, D.** 2002. Leptin regulation of reproductive function and fertility. Theriogenology. 57(1):73-86.

Stevenson, J. 1997. Clinical reproductive physiology of the cow. In: Current Therapy in large animal. Theriogenology. Edit by Younquist, R. Vol I. Saunders Company Phyladelphia. p. 257-267.

Skidmore, J.; Allen, W.; Heap, R. 1994. Oestrogen sintesis by the peri-implantation conceptus of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). J Reprod Fertil. 101:362-267.

Skidmore, J.; Allen, W.; Heap, R. 1997. Maternal recognition of pregnancy in the dromedary camel. J. Camel Practice and Research. 4(2):187-192.

Steinkampf, M.; Mendelson, C.; Simpson, E. 1988. Effects of epidermal growth factor and insulin like growth factor 1 on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P450 of human ovarian granulose cells. Mol Cell Endocrinol. 59:93-98.

Sumar J. 1983. Empadre de hembras alpacas de una año de edad. Resum. De Proyec. Inv: realizadas por la UNMSM (1975-1979). Lima. 2:123

Sumar, J. 1989. Anatomía ultrasónica del aparato genital de la alpaca hembra. En: Resum XII Reunión Cient Anu Asoc Peruana Prod. Anim. Perú. Lima. p. 65.

Sumar, J. 1993. Efectos de los estímulos de inducción en la ovulación de alpacas y llamas. Rev. Pec. IVITA. Perú. 6(1):17-21.

Sumar, J. 1997. Avances y Perspectivas en Reproducción de Camélidos. En: Memorias del I Symposium Internacional Avances en Reproducción de Rumiantes. Lima. p.30-44.

Sumar, J. 2000. Llamas and Alpacas. In: Reproduction in farm animals. Edit by Hafez, ESE. 7th edition. USA p. 218-228.

Sumar, J., C. Novoa; Fernández Baca, S. 1972. Fisiología reproductiva post-partum en la alpaca. Rev. Inv. Pec. IVITA. UNMSM. 1(1):21-27.

Sumar J.; Leyva V. 1979. Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la llama (*Lama glama*). En: Resum de Proyec. de Inv. realizados por la UNMSM (1975-1979). Lima. Tomo II. p.124.

Sumar; J.; García, M. 1985. Diagnóstico precoz de gestación en alpacas basado en niveles de progesterona de la leche. Estudio preliminar. En: V Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Libro de Resúmenes. Cusco. p.22.

Sumar, J.; Alarcón, V. 1989. Estímulo coital y fertilidad en alpacas. En: Resum XII Reunión Cient Anu Asoc Peruana Prod. Anim. Perú. Lima. p. 67.

Thomas, F.; Armstrong, D.; Telfer, E. 2003. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 1(1):76.

Tilly, J.; Billig, H.; Kowalski, K.; Hsueh, A. 1992. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism *Molec Endocrinology.* 6, 1942-1950.

Vaughan, J.; D'Occhio, M.; Macmillan, K. 2000. Ovarian follicular inter-wave intervals in Alpacas. In: 14th International Congress on Animal Reproduction. Abstract. Stockholm. 1:59.

Vivanco, W.; Cárdenas, H.; Bindon, B. 1985. Relación entre la duración de la cópula y momento de ovulación en alpacas. En: Resum XII Reunión Cient Anu Asoc Peruana Prod. Anim. Perú. Lima. p.19.

Webb, R.; Royal, M.; Gong, J.; Garnsworthy, P. 1999. The influence of nutrition on fertility. *Cattle Practice.* 7:227-234

Webb, R.; Nicholas, B.; Gong, J.; Campbell, B.; Gutierrez, C.; Garverick, H.; Armstrong, D. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl.* 61:71-90.

Willis, H.; Monaghan, P.; Kirkwood, R. 1999. Leptin: an indicator of body condition and reproductive performance?. *Adv in Pork Prod.* 10(8).

Zeuner, A.; Müller, K.; Reguszynski, K.; Jewgenow, K. 2002. Apoptosis within bovine follicular cells and its effects on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology.* 8737:1-13

VIII.- APÉNDICE

Apéndice 1.- Tamaño folicular en los diferentes grupos

GRUPO	OBS.	PROM.	DEV. STD.	MIN	MAX
1	22	6	0	6	6
2	30	8.67	1.49	7	12
3	30	8.83	1.42	7	13
4	29	7.83	1.07	7	12

Apéndice 2.- Ocurrencia de ovulación en los diferentes grupos al día 2 post cópula

GRUPO	NO PRESENTA	SI PRESENTA	TOTAL	PORCENTAJE
GRUPO 1	1	21	22	95.45
GRUPO 2	1	29	30	96.67
GRUPO 3	0	30	30	100.00
GRUPO 4	1	28	29	96.55
TOTAL	3	108	111	
PORCENTAJE		97.30	100	

Pearson $\chi^2(3) = 1.2241$ Pr = 0.747

Apéndice 3.- Tamaño del Cuerpo Lúteo en los diferentes grupos

GRUPO	OBS.	PROM.	DEV. STD.	MIN	MAX
1	21	10.28	1.74	7	13
2	29	11.72	1.73	9	15
3	30	11.07	1.96	7	16
4	28	11.11	2.23	7	15

Apéndice 4.- Evaluación del Tamaño del Cuerpo Lúteo en los diferentes grupos mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía.

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	25.2555738	3	8.4185246	2.24	0.0878
Within groups	390.624056	104	3.75600054		
Total	415.87963	107	3.88672551		

Apéndice 5.- Análisis de Supervivencia de KAPLAN-MEIER para los días 15, 20, 25, 30 y 35 post cópula.

	Tiempo	Total	Muerte	Sobrevivencia	Error Std.	(95% Int. Conf.)
GRUPO 1	15	21	5	0.7619	0.0929	0.5194 0.8933
	20	16	4	0.5714	0.1080	0.3380 0.7492
	25	16	0	0.5714	0.1080	0.3380 0.7492
	30	16	0	0.5714	0.1080	0.3380 0.7492
	35	11	1	0.5238	0.1090	0.2967 0.7088
GRUPO 2	15	29	7	0.7586	0.0795	0.5594 0.8769
	20	22	2	0.6897	0.0859	0.4883 0.8248
	25	20	1	0.6552	0.0883	0.4541 0.7973
	30	20	0	0.6552	0.0883	0.4541 0.7973
GRUPO 3	35	19	0	0.6552	0.0883	0.4541 0.7973
	15	30	12	0.6000	0.0894	0.4045 0.7495
	20	30	0	0.6000	0.0894	0.4045 0.7495
	25	30	0	0.6000	0.0894	0.4045 0.7495
	30	18	1	0.5667	0.0905	0.3733 0.7208
GRUPO 4	35	16	1	0.5333	0.0911	0.3428 0.6914
	15	28	14	0.5000	0.0945	0.3064 0.6662
	20	28	0	0.5000	0.0945	0.3064 0.6662
	25	14	2	0.4286	0.0935	0.2457 0.5996
	30	14	0	0.4286	0.0935	0.2457 0.5996
	35	12	0	0.4286	0.0935	0.2457 0.5996

Apéndice 6.- Análisis de la Supervivencia mediante la Prueba de Log-Rank

GRUPO	EVENTOS OBSERVADOS	EVENTOS ESPERADOS
1	10	9.92
2	10	13.97
3	14	13.80
4	16	12.30
TOTAL	50	50.00

chi2(3) = 3.11
Pr>chi2 = 0.3751