

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Inducción de ovulación con plasma seminal o análogo
de GnRH (acetato de Buselerina) y su efecto sobre la
tasa de concepción en alpacas (vicugna pacos),
inseminadas con semen fresco**

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Julia Wayta Palián López

LIMA – PERÚ

2010

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida y guiar mis pasos. A la Virgen María Auxiliadora por ser la Madre que desde el cielo me protege.

A mis padres, Dora y Teófilo, que con su amor, dedicación y trabajo hacen de mí una mejor persona cada día. A mi hermano Diego, por compartir su vida conmigo y alegrar mi corazón todos los días.

A mis abuelos, Jesús y Teófilo, que me cuidan desde el cielo

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Wilfredo Huanca, por su apoyo
como amigo, por sus conocimientos
compartidos como maestro y su paciencia
como padre.

A la memoria del Dr. Héctor Huamán, por su
inolvidable sonrisa y sus sabios consejos en las
conversaciones compartidas.

A Dianita y Heberht por su
cooperación incondicional en este
estudio.

A mis amigos, Anali, Charito, Manuel,
William, Gianfranco, Silvia, Katherine,
Jonathan, Oliver y José C. Muchas gracias
por brindarme su cariño y apoyo.

Al Consejo Superior de Investigaciones del
Vicerrectorado de Investigación de la
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR
DE SAN MARCOS, por su valiosa colaboración
en la ejecución de este proyecto.

A la ONG DESCO. principalmente a la Dra.
Emma Quina por sus enseñanzas y su paciencia
para la elaboración de esta tesis.

A Raúl Mamani, Celia Condori,
Hernán Melgar, Verónica Condori,
Maribel y Don Claudio por su
importante cooperación para conmigo.

Muchas gracias también a los Drs. Antonio
Ampuero, José Camacho y Francisco Suárez.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Fisiología Reproductiva de la alpaca hembra.....	3
2.1.1 Pubertad.....	3
2.1.2 Estacionalidad y comportamiento sexual.....	4
2.1.3 Mecanismo neuroendocrino en el control reproductivo.....	5
2.1.4 Dinámica folicular.....	7
2.1.5 Ovulación.....	8
2.1.6 Cuerpo lúteo.....	11
2.1.7 Inducción de ovulación.....	12
2.1.8 Fecundación y desarrollo embrionario.....	13
2.1.9 Ultrasonografía en la reproducción.....	14
2.2 Fisiología reproductiva del macho.....	16
2.2.1 Bases anatómicas.....	16
2.2.2 Pubertad.....	17
2.2.3 Comportamiento sexual.....	19
2.2.4 Espermatogénesis.....	20
2.2.5 Control endocrino de la espermatogénesis.....	21
2.2.6 Características del semen de camélidos.....	21
2.2.7 Bioquímica del plasma seminal.....	25

2.2.8	Plasma seminal como inductor de ovulación.....	26
2.2.9	Inseminación artificial.....	28
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1	Lugar de estudio.....	31
3.2	Unidades experimentales.....	31
3.3	Obtención del plasma seminal	31
3.4	Diseño experimental.....	32
3.5	Análisis estadístico.....	35
IV.	RESULTADOS.....	36
V.	DISCUSIÓN.....	41
VI.	CONCLUSIONES.....	44
VII.	LITERATURA CITADA.....	45
VIII.	APÉNDICE.....	59

RESUMEN

El presente estudio fue realizado para determinar la tasa de concepción de alpacas inseminadas con semen fresco e inducidas a ovulación con plasma seminal o un análogo de GnRH (Acetato de buserelina). El estudio se realizó entre los meses de enero a abril del 2009. En un primer experimento, se seleccionaron 64 alpacas hembras con cría al pie, en base al criterio de la presencia de un folículo dominante \geq de 7 mm detectado por ecografía transrectal. Los animales seleccionados fueron alimentados con pastura natural y recibieron las mismas condiciones de manejo; siendo distribuidas al azar a uno de los 2 tratamientos: G₁ (n=32) administración intramuscular de 2 ml de plasma seminal y G₂ (n=32) administración intramuscular de 1 ml de un análogo de GnRH (0.0042 mg de acetato de buserelina). Después de 27 horas de la aplicación de los tratamientos, se realizó la inseminación artificial a dosis de 1 ml de semen fresco diluido con una concentración espermática promedio de 130×10^6 / ml y una motilidad espermática \geq 65%. Las alpacas fueron evaluadas mediante ecografía transrectal el día 2 post tratamiento para determinar la tasa de ovulación y el día 25 para determinar gestación. En el segundo experimento, fueron seleccionadas 10 alpacas con folículos \geq 7 mm, a las cuales se les administró vía IM 2 ml de plasma seminal (n=5) o 1 ml de un análogo de GnRH (n=5). Al octavo día post aplicación se realizaron ecografías para medir el diámetro del cuerpo lúteo. Los resultados del experimento 1 indican una tasa de ovulación de 100 % para el grupo de plasma seminal y 90.6 % para el grupo de GnRH y tasa de gestación al día 25 del 75 y 53.1 % para los grupos G₁ y G₂, respectivamente ($p < 0.05$). En el experimento 2, el tamaño del cuerpo lúteo de alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal fue de 15.2 ± 1.1 mm y con GnRH fue de 12.6 ± 2.1 mm. Los resultados del estudio sugieren que la administración de plasma seminal en alpacas induce un 100 % de ovulación en alpacas y mejoran la tasa de concepción de los animales inseminados, por un mejor efecto luteotrópico en la formación del cuerpo lúteo.

Palabras claves: Alpacas, plasma seminal, ovulación inducida, inseminación artificial., gestación.

SUMMARY

This study was carried out to evaluate the pregnancy rate in alpacas inseminated with fresh semen and that were induced to ovulation with seminal plasma or a GnRH analogue (Acetate of buserelin). The study was developed from January to April in 2009. In experiment, sixty four alpacas with breeding were selected based on the criterion of the presence of follicle ≥ 7 mm by ultrasound. Animals were fed with natural pasture and they received the same handling conditions, they were distributed at random one of the two treatments: G₁ (n=32) 2 ml of seminal plasma by intramuscular injection or G₂ (n=32) 1 ml of GnRH (0.0042 Acetate of buserelin). After 27 hours of application of treatments, artificial insemination was performed at a dose of 1 ml of fresh diluted semen with a mean sperm concentration of 130×10^6 /ml and sperm motility $\geq 65\%$. Alpacas were evaluated by ultrasound at Day 2 post treatment to determinate rate ovulation and at Day 25 were evaluated to diagnose pregnancy. In experiment 2, were selected 10 alpacas with follicles ≥ 7 mm, which were administered intramuscularly 2 ml of seminal plasma (n=5) or 1 ml of a GnRH analogue (n=5). At 8 day post application, ultrasounds were performed to measure the diameter of the corpus luteum. Results of experiment 1 point out a rate ovulation of 100% for the seminal plasma group and 90.6% for the GnRH and pregnancy rate at day 25 were 75.0% and 53.1% for groups G1 y G2, respectively ($p < 0.05$). In experiment 2, the size of the corpus luteum in alpacas induced to ovulation with seminal plasma 15.2 ± 1.1 mm and GnRH was 12.6 ± 2.1 mm. Results of present study suggest that administration of seminal plasma induce 100 % ovulation in alpacas and improve a pregnancy rate in inseminated animals for a better luteotropic effect in the formation of corpus luteum.

Key words: Alpacas, seminal plasma, ovulation induced, artificial insemination, pregnancy.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Componentes bioquímicos del plasma seminal de llamas y alpacas.....	25
Cuadro 2.- Distribución de Grupos experimentales.....	31
Cuadro 3.- Tasa de concepción en alpacas posterior a la aplicación IM de plasma seminal y GnRH.....	35
Cuadro 4.- Tamaño folículo dominante y tasa de Ovulación el día D ₂ en alpacas con aplicación intramuscular de Plasma seminal y GnRH.....	36
Cuadro 5.- Diámetro del cuerpo lúteo (mm) el día 8 post tratamiento.....	37
Cuadro 6.- Características del eyaculado de 3 machos utilizando Vagina artificial y maniquí de alpaca.....	38
Cuadro 7.- Intervalo de horas entre la inducción de ovulación y la Inseminación artificial...	39

Pág.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.- Diseño experimental 1.....	33
Fig. 2.- Diseño Experimental 2.....	34

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos es una actividad de gran importancia socio-económica en la ganadería altoandina debido a que suministran fibra y carne (Fernández Baca, 1993).

Las especies de ovulación inducida como los camélidos sudamericanos, necesitan un estímulo para la ovulación que generalmente es la cópula (San Martín *et al.*, 1968), donde luego de causar la liberación de la hormona luteinizante da lugar a la ovulación. Sin embargo, esta no es la única manera para inducir ovulación, también se ha reportado el uso de hormonas como la hCG (San Martín *et al.*, 1968), LH y GnRH (Sumar y Bravo, 1981; Aller *et al.*, 1999 y Huanca *et al.*, 2001)

Se ha sugerido la presencia de un “Factor inductor de Ovulación” en el plasma seminal, debido a un experimento donde se encontró una tasa de ovulación de 87 % en camellos bactrianos hembras luego de la administración del plasma seminal (Chen *et al.*, 1985).

En alpacas y llamas se demostró que el plasma seminal luego de una aplicación intramuscular, puede inducir ovulación en la hembras con una tasa de ovulación de 100% (López *et al.*, 2006). Adams (2005) reportó una tasa de ovulación mayor del 90 % en alpacas y llamas que fueron tratadas con plasma seminal, sugiriendo que el plasma seminal estimula un incremento el las concentraciones circulantes de LH.

La inseminación artificial representa un potencial importante para el mejoramiento genético de la alpaca porque permitirá el uso eficiente de los machos más sobresalientes (Bustanza, 2001). También permite el uso de múltiples dosis de semen de cada eyaculado. El conocimiento adquirido sobre colección, caracterización, preservación e inseminación del semen de alpaca acelerarán la viabilidad de los servicios de la inseminación artificial de alpacas. Esto beneficiará la producción de la fibra de alpaca (Vaughan *et al.*, 2003).

El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar la tasa de concepción de alpacas inseminadas con semen fresco e inducidos a ovulación con plasma seminal o con un análogo de GnRH (Acetato de busrelina).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- Fisiología reproductiva en la Hembra

2.1.1.- Pubertad

Un animal ha llegado a la pubertad cuando es capaz de liberar gametos y mostrar un comportamiento sexual (Hafez, 2000). La actividad ovárica empieza a los 10 meses de edad, con la presencia de folículos de 5 mm o más de diámetro, sin embargo las alpacas hembras a los 12 a 13 meses de edad pueden mostrar una actividad sexual similar a la de la alpaca adulta, siendo las tasas de ovulación y fecundación similares a las de hembras adultas (Fernández Baca y Novoa 1968; Novoa *et al.*, 1972).

En alpacas hembras primerizas se encontró relación entre el peso corporal y la tasa de natalidad, donde el peso mínimo fue de 33 Kg al año de edad para obtener una tasa de preñez aproximada al 50 %; y que por cada kilogramo de incremento de peso corporal hubo 5% de incremento en el porcentaje de natalidad (Leyva y Sumar, 1981).

Las alpacas y llamas hembras son usualmente empadradas por primera vez a los 12 meses de edad en regiones donde los requerimientos nutricionales son alcanzados y las hembras han alcanzado dos tercios de su peso adulto (Fernández Baca *et al.*, 1972; Novoa *et al.*, 1972).

Aunque la alpaca hembra es capaz de reproducirse desde un año de edad, la práctica general de manejo es demorada hasta los 2 años de edad causada por una inadecuada alimentación ocasionando un pobre crecimiento (Fernández Baca, 1993).

2.1.2.- Estacionalidad y comportamiento sexual

Los camélidos sudamericanos pueden reproducirse durante todo el año (Sumar, 2000). Por eso las alpacas y llamas son consideradas como reproductores no estacionales. Se ha señalado que la actividad ovárica en alpacas se produce a lo largo de todo el año y que la estación no afecta el número de folículos > 6 mm observados en los ovarios (Bravo y Sumar, 1989). Sin embargo la estacionalidad reproductiva durante los meses de diciembre a marzo depende más del manejo y disponibilidad de alimento, que de la influencia estacional sobre la fisiología reproductiva (Novoa, 1991).

Cuando las alpacas hembras se mantienen separadas de los machos, éstas muestran periodos de receptividad sexual prolongados y periodos breves de rechazo del macho que pueden durar 48 horas. Si se permite la copulación solo una vez al mes, ambos sexos tienen actividad durante todo el año; las tasas de ovulación y fecundación junto con la sobrevivencia del embrión no se vieron afectadas de manera significativa por la estación (Fernández Baca, 1972). Por el contrario la asociación continua de hembras y machos inhibe la actividad sexual de estos últimos e inclusive provoca desaparición por completo (Fernández Baca, 1972).

Pollard *et al.*, (1995) observó que alpacas hembras en Nueva Zelanda tuvieron menos receptividad sexual y la duración de la monta fue menor en primavera. Las primerizas estuvieron más propensas a escapar y patear que las hembras experimentadas. Se desconocen los factores que causan el inicio y la terminación de la actividad sexual bajo condiciones naturales. Factores ambientales, además de la estimulación visual y olfatoria, podrían influir a través del sistema nervioso central.

El comportamiento sexual de los camélidos sudamericanos es complejo (Adams *et al.*, 1989) y la variabilidad puede estar relacionada con la ubicación geográfica, grado de domesticación y la estructura social de la manada (Novoa, 1970).

Existe una relación entre la receptividad sexual, el tamaño folicular y las concentraciones plasmáticas de estrógeno en hembras no apareadas (Bravo, 1994; Bravo *et al.*, 1991; Fernández Baca *et al.*, 1970; Pollard *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 2003). La receptividad sexual en

camélidos también esta asociada con un bajo nivel de progesterona (Adams *et al.*, 1989; Fernández, 1993; Sumar *et al.*, 1988).

Las hembras son usualmente receptivas a la monta a pesar del estado del desarrollo folicular (Sumar *et al.*, 1993), y la negativa a un macho no necesariamente indica ausencia de un folículo maduro (Bravo *et al.*, 1994).

Cuando la hembra alpaca es requerida por el macho, usualmente emprende veloz carrera hasta que finalmente si está en celo se detiene y se deja montar de pie, para luego caer echada sobre su vientre y aceptar la cópula. En contraste con esa conducta, otras hembras en celo se acercan cautelosamente a las parejas que están en apareamiento, huelen al macho y luego se echan al suelo permaneciendo en esa posición a veces por todo el tiempo que dura la cópula. Algunas hembras montan a otras que están echadas, ejecutando movimientos pélvicos similares a los del macho. La hembra no receptiva, al ser requerida por el macho, trata de escapar y se defiende pateando y escupiendo (Sumar, 1983; Novoa y Leyva, 1996).

2.1.3.- Mecanismo neuroendocrino en el control reproductivo

La hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH es el neuropéptido clave que controla la función reproductiva en todas las especies vertebradas. El principal mecanismo en la liberación preovulatoria de GnRH en los ovuladores inducidos, incluyendo los conejos, hurones, gatos y camellos; implica la activación de las neuronas noradrenérgicas del cerebro medio y del encéfalo en respuesta a las señales somatosensoriales genitales generadas por la introducción del órgano copulatorio de un macho durante la monta. Estas neuronas noradrenérgicas proyectan un estímulo al hipotálamo basal medio y cuando se activa, promueve la liberación de GnRH desde terminales nerviosos en la hipófisis media. En cambio, las señales neuronales que provocan un incremento de LH preovulatorio de estas especies parecen ser principalmente de excitación. Se sugiere que las acciones de retroalimentación positiva de las hormonas esteroides sobre la liberación de GnRH se reducen o se ausentan en especies de ovulación inducida (Bakker y Baum, 2000).

El control neuroendocrino de la reproducción en la hembra está determinada por una compleja interacción entre hormonas hipotálamicas, hipofisiarias y gonadales. En las especies de ovulación inducida, como los camélidos sudamericanos, la estimulación coital provoca un reflejo neuroendocrino, como principal mecanismo para activar el centro de la GnRH (Bakker y

Baum, 2000) y estimular en la hipófisis la secreción pulsátil de LH (Arthur, 1991); sin embargo no se afecta la secreción de FSH (Bravo *et al.*, 1991).

La Hormona foliculo estimulante o FSH es esencial para el inicio del desarrollo y para el mantenimiento de los folículos ováricos en los mamíferos, en presencia de LH estimula la secreción de estrógeno por los folículos ováricos; la LH estimula la producción de testosterona en la teca interna y la FSH estimula la aromatización de la 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, activando la GnRH y dando por resultado la secreción preovulatoria de LH (Hafez, 1996), que es pulsátil, como resultado de la liberación de LH presintetizada contenida en los gránulos de almacén de las células gonadotrofas de la hipófisis (McNeilly *et al.*, 2003). El estrógeno es regulador de la FSH a través del mecanismo de retroalimentación negativo conjuntamente con la inhibina, quienes afectan directamente al mRNA FSH beta y por consiguiente la síntesis de FSH (McNeilly *et al.*, 2003).

El rol principal de la secreción preovulatoria de LH es causar la ruptura folicular y la consiguiente liberación del óvulo (Fernández Baca, 1971), es decir la inducción de la ovulación luego de la cual las células del folículo ovulatorio se luteinizan y empieza la secreción de progesterona, 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); resultados de Harris *et al.* (1999) demostraron justamente que la progesterona es capaz de inhibir el efecto positivo del estradiol sobre el hipotálamo. Por otro lado, estudios *in vitro* de Komare *et al.* (2001) encontraron que poco después de la secreción preovulatoria de LH el tejido folicular disminuye su capacidad de secretar estradiol, puesto que la conversión de testosterona a estradiol declina en coordinación con la reducción de las enzimas involucradas en dicho proceso.

Cuando no ocurre fecundación, durante el periodo de actividad del cuerpo lúteo, los estrógenos producidos por los folículos dominantes inducirán el aumento de receptores de oxitocina en el útero, esta hormona estimulará la producción de PGF2 α 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 PGF2 α desde el útero al CL probablemente sirve como un mecanismo que asegura la luteólisis, debido a que la oxitocina luteal serviría para amplificar las señales neurales de oxitocina siendo traducidas por el útero en pulsos de PGF2 α (McCracken *et*

al., 1999). Producida la luteólisis los niveles de progesterona declinan permitiendo el resurgimiento de los niveles de LH (Stevenson, 1997).

2.1.4.- Dinámica folicular en Camélidos Sudamericanos

En alpacas y llamas hembras en ausencia de macho, se desarrollan ondas foliculares anovulatorias, hasta que un estímulo adecuado active la ovulación (Adams *et al.*, 1990; Skidmore *et al.*, 1995). En cada onda folicular solo un folículo se hace dominante, crece para madurar y alcanzar el tamaño ovulatorio (≥ 7 mm de diámetro); los demás regresionarán (Bravo *et al.*, 1990; Fernández Baca, 1993; Brown, 2000). Adams *et al.* (1990) observó que en cualquier momento durante el desarrollo de las ondas foliculares no ovulatorias, uno podría esperar encontrar un folículo de al menos 6 a 7 mm de diámetro y que una nueva onda folicular recluta un nuevo folículo inmediatamente después de la monta y ovulación.

El folículo dominante tiene tres fases o estadios de desarrollo: crecimiento, maduración y regresión (Bravo *et al.*, 1990; Novoa, 1991). A pesar de que la fase de crecimiento no es muy conocida en camélidos, se cree que los cambios iniciales producidos son similares a los ocurridos en otras especies. En la fase de maduración o estática se reporta que el folículo dominante inhibe el desarrollo de folículos más pequeños (Bravo *et al.*, 1990) debido a la existencia de una relación inversamente proporcional entre el número de folículos detectados y el diámetro del folículo dominante (Adams *et al.*, 1990); siendo la secreción de inhibina responsable de la supresión del crecimiento de los folículos subordinados (Bravo *et al.*, 1990). Por otro lado, Adams (2001) reporta que el folículo dominante alcanza un menor diámetro en preñadas (9.7 ± 0.2 mm), que en no preñadas (11.5 ± 0.2 mm) y anovulatorias (12.1 ± 0.4 mm); hecho que se explicaría por el efecto inhibitorio de la progesterona sobre el crecimiento folicular al estar presente el cuerpo lúteo.

Con respecto a la fase de regresión, está se da debido a que el folículo dominante controlaría su propia duración (Adams, 2001); por lo tanto si no hay ovulación se atresia (Bravo *et al.*, 1990). Durante la atresia folicular, el rápido reemplazo del folículo dominante ocurre dentro de los 2 – 3 días siguientes luego de la primera reducción en el tamaño del folículo dominante (Vaughan *et al.*, 2001). El crecimiento y regresión de los sucesivos folículos dominantes pueden superponerse en camélidos sudamericanos por 1 – 4 días debido a que como un folículo grande está en regresión, otro está a punto de convertirse en dominante.

El desarrollo de la onda folicular en camélidos sudamericanos dura un promedio de 13.8 días; donde la fase de crecimiento folicular toma aproximadamente 4.8 ± 1.5 días; la fase de maduración folicular, donde el folículo alcanza un tamaño preovulatorio tiene una duración de 5 ± 1.6 días y la fase de regresión folicular dura 4.0 ± 1.1 días (Bravo *et al.*, 1990). No obstante en otro estudio, Adams *et al.* (1990) determinaron un largo total de 20 a 25 días; y Aba *et al.* (2000) alcanzó a establecer un largo de onda en 22.6 ± 2.5 días; donde la fase de crecimiento duró 9.2 ± 2.8 días (desde 3 mm a su máximo diámetro); la fase de maduración de 5.2 ± 1.4 días y la de regresión de 8.2 ± 2.2 días; indicando que las diferencias encontradas se deberían al estado de lactancia de los animales del estudio. Los folículos muestran una tasa de crecimiento de 0.43 ± 0.02 mm / día, entre los días 0 y 10, por lo que la mayoría de los folículos alcanzó una medida de 6 o 7 mm de diámetro a los 6 – 8 días (Vaughan *et al.*, 2004).

El intervalo entre ondas foliculares, que es el tiempo en días entre la emergencia de folículos dominantes sucesivos, es en promedio de 18 ± 2.5 días en llamas (Chaves *et al.*, 2002); y 15.8 ± 0.6 días en alpacas (Vaughan *et al.*, 2000). Los primeros 10 días después de la emergencia de una nueva onda folicular, la tasa de crecimiento folicular en alpacas es constante, independientemente del posterior intervalo entre ondas (Vaughan *et al.*, 2004)

Un estudio en alpacas (Bravo y Sumar, 1989) y otro en llamas (Bravo *et al.*, 1990) sugieren que el folículo dominante de ondas foliculares sucesivas se alternó regularmente entre los ovarios derecho e izquierdo en un 80 % de los intervalos. Sin embargo, Adams *et al.* (1990) demostró que no hubo diferencia en la incidencia de alternancia de folículos dominantes sucesivos entre los ovarios derecho e izquierdo.

El pico de las concentraciones plasmáticas de estradiol coinciden con el tamaño máximo folicular a los 10 – 13 días después del inicio del folículo en crecimiento en alpacas a los 8 días (Vaughan, 2001). Los cambios en la frecuencia del pulso de la LH presumiblemente regulan el movimiento folicular en camélidos sudamericanos, así como la presencia de progesterona reduce los intervalos entre ondas foliculares después de la ovulación y durante la gestación (Adams *et al.*, 1990).

2.1.5.- Ovulación

A diferencia de otros animales domésticos, los camélidos son especies de ovulación inducida por la cópula (San Martín *et al.*, 1968) y por la administración artificial de Gonadotropina coriónica humana (hCG) (Fernández Baca *et al.*, 1970) o GnRH (Bravo *et al.*,

1992). La ovulación en alpacas ocurre a las 26 horas después del apareamiento natural y 24 – 30 horas después del tratamiento con hCG (San Martín, 1968), GnRH o LH (Fernández Baca, 1971; Novoa, 1991; Sumar, 1997; Leyva y García, 1999; Aller *et al* 1999; Huanca *et al.*, 2001). La tasa de ovulación, el intervalo de ovulación y el desarrollo luteal fueron similares en llamas luego de ser tratadas con LH o GnRH o de monta natural para inducir ovulación en llamas alcanzando un intervalo de 29 a 30 horas (Ratto *et al.*, 2006).

Para que ocurra la ovulación se requiere la presencia del macho y el apareamiento, por lo cual no es necesario el incremento de estrógenos para iniciar el proceso que conduce a la descarga ovulatoria de LH (Novoa y Leyva, 1996). El coito induce a un rápido reflejo neuroendocrino con señales que llegan al hipotálamo a lo largo de varias vías aferentes a pocos minutos de iniciado el apareamiento (Spies *et al.*, 1997). El estímulo neural, el cual influye en el eje neuroendocrino en camélidos para inducir un aumento de LH en las hembras, incluye la penetración a la cervix donde se produce contacto físico y emisión de ruidos guturales (Bravo, 1994; Fernández Baca *et al.*, 1970) como también la presencia de un factor de inducción de ovulación en el semen (Adams, 2005; Chen *et al.*, 1985).

El estímulo efectivo es la introducción del pene ya que la monta sin penetración resulta en bajos porcentajes de ovulación (Fernández Baca, 1993). Fernández Baca *et al.* (1970) examinaron el efecto de diferentes estímulos de monta para la inducción de ovulación en alpacas encontrando que la tasa de ovulación fue baja en las hembras que fueron montadas por otras hembras o aquellas montadas sin copulación y no hubo diferencia significativa de aquellas hembras que no recibieron ningún estímulo. Las hembras que fueron empadradas por un macho entero o vasectomizado ovularon 77 – 82 % del tiempo, indicando que la monta y la introducción del pene son necesarias para brindar una adecuada estimulación para la ovulación. (Fernández Baca *et al.*, 1970).

Se sugiere que a mayor tiempo de cópula se obtiene mayor porcentaje de alpacas que ovulan, sin embargo se ha encontrado que la respuesta es variable, ya que hembras con más de 20 minutos pueden no llegar a ovular mientras que otras con 5 minutos si ovulan (Vivanco *et al.*, 1985). Un segundo estímulo con cópula o tratamiento con GnRH entre las 6 y 24 horas después de un primer estímulo no produce respuesta en la liberación de LH siendo los valores de LH similares a los de hembras que no ovulan (Bravo *et al.*, 1992). Se han reportado casos de ovulación espontánea sin previo estímulo coital por lo que se atribuye la ovulación a estímulos visuales, olfatorios y sensitivos (Fernández Baca *et al.*, 1970; Sumar, 1993).

Un diámetro folicular de 6 a 7 mm se considera adecuado para producir la ovulación en alpacas. Por consiguiente, el momento óptimo de reproducción parece ser 6 – 8 días después de la nueva onda folicular emergente durante el crecimiento o en la fase de maduración temprana de un folículo dominante (Adams *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1991b; Sumar *et al.*, 1993).

No se encontraron diferencias en la tasa de ovulación entre ovarios. La ovulación ocurre con igual frecuencia en los ovarios izquierdo y derecho (Bravo *et al.*, 1993; Fernández Baca *et al.*, 1970). Se detectó un cuerpo lúteo en el ovario derecho en 51 % de las alpacas, 47% en el izquierdo, y 2 % en ambos ovarios (Fernández Baca, 1973).

Luego de la cópula, las concentraciones de LH se incrementan de 1 – 2 ng/ml a 5 – 7 ng/ml (Bravo *et al.*, 1988; Aba *et al.*, 1995). Los picos de LH se alcanzan entre las 2 a 3 horas siguientes a la ovulación (Bravo *et al.*, 1991) y las concentraciones elevadas de LH se mantienen por 5 horas (Bravo *et al.*, 1988).

La respuesta de LH a la cópula es dependiente del tamaño folicular en alpacas y llamas. Así las llamas y alpacas con folículos mayores a 7 mm (en crecimiento o maduros) liberaron cantidades de LH hipofisiaria entre 55.1 a 62.4 ng/ml/h, suficientes para inducir la ovulación y formación de un cuerpo lúteo normal, a diferencia de las hembras con folículos menores a 7mm las cuales liberaron cantidades significativamente menores de LH (29.1 ng/ml/h), lo cual no fue suficiente para inducir ovulación, por el contrario estimuló un continuo desarrollo del folículo dominante (Bravo *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1989). Aunque en estudios recientes se ha determinado que animales con folículos de 6 mm en el momento del apareamiento también ovularon pero en menor porcentaje que aquellos animales con folículos \geq de 7 mm (Cervantes *et al.*, 2004). El incremento de LH altera la estructura y función del folículo pre-ovulatorio anterior a la ovulación dejando a la maduración del ovocito, interrupción de las células de adhesión y la ruptura de la pared folicular (Khatir *et al.*, 2005, 2004; Tibary, 2001)

No existe relación significativa entre el tamaño folicular y el tiempo de ovulación post-cópula (Adams *et al.*, 1990; Sumar, 1993). Adams (1990) no encontró efecto significativo del estado de lactancia o resultado de la monta (falla para concebir versus concepción) en el intervalo desde la monta hasta la ovulación en llamas. Ellos también encontraron que la tasa de crecimiento folicular promedio desde la monta hasta la ovulación fue mayor con folículos de de 7 – 9 mm de diámetro (0.61 mm/día) comparado con los folículos 10 – 12 mm de diámetro (0.3 a 0.2 mm/día)

2.1.6.- Cuerpo Lúteo

Después de la ovulación, las células foliculares que secretan estrógenos se transforman y secretan progesterona. Esta estructura se conoce como cuerpo lúteo (Novoa y Leyva, 1996). Si existe fecundación entonces el cuerpo lúteo se mantiene durante toda la gestación (García *et al.*, 1995). El cuerpo lúteo, puede detectarse directamente por palpación rectal o ultrasonografía (Adams *et al.*, 1991; Bravo y Fowler, 1988) e indirectamente por la presencia de progesterona en el plasma (Bravo *et al.*, 1990) y pregnadiol en orina (Sumar 1988). Los niveles de progesterona circulante mayores de 2 ng/ml son considerados una fuerte indicación de la presencia de un cuerpo lúteo maduro y funcional (Adams *et al.*, 1991).

La luteinización se inicia con la secreción del pico pre-ovulatorio de LH (García *et al.*, 1995), dándose el inicio de la organización estructural y funcional del cuerpo lúteo; las células tecales se luteinizan para dar lugar a las células tecales pequeñas, además se produce la hipertrofia y luteinización de las células de la granulosa dando lugar a las células luteales grandes (Hafez, 1996). Esta nueva organización altera la vía estereoidogénica, produciendo la secreción de progesterona por las células luteales pequeñas y grandes.

El cuerpo lúteo aumenta gradualmente de tamaño y actividad secretoria de progesterona, dándose correlación positiva entre sí (Fernández Baca, 1971). El diámetro promedio del cuerpo lúteo 3 días después del servicio o 48 horas post ovulación es de 7.72 mm para el ovario izquierdo y de 8.67 mm para el ovario derecho (Fernández-Baca *et al.*, 1970).

En alpacas preñadas o no, el cuerpo lúteo alcanzan su máximo desarrollo el día 8 – 9 post cópula o administración de hCG, donde el tamaño máximo reportado fue de 14 mm de diámetro. El día 4 comienza a incrementarse las concentraciones de progesterona en sangre, alcanzando niveles máximos al día 8 post servicio. De aquí en adelante en las hembras no preñadas descienden los niveles de progesterona los días 10 y 11, por lo tanto la vida media del cuerpo lúteo es de 8 a 9 días, donde las hembras pueden ser sexualmente receptivas de nuevo aproximadamente a los 12 - 14 días después de la monta cuando la concepción no ocurre. Por otro lado en las hembras preñadas el día 13 se produce una disminución transitoria de los niveles de progesterona volviendo a alcanzar los niveles normales el día 18 (Fernández Baca *et al.*, 1970; Adams *et al.*, 1991).

La disminución transitoria de progesterona sugiere la acción de la prostaglandina F₂ α sobre el cuerpo lúteo (Fernández Baca, 1993). La PGF₂ α , secretada por el endometrio, puede ser el

agente luteolítico en camélidos sudamericanos, debido a que se demostró que la prostaglandina exógena ocasiona luteólisis, sólo cuando se administra después del cuarto día de la fase luteal inducida. En hembras no preñadas la caída de progesterona coincide con un incremento en los niveles de prostaglandina entre los días 9 y 12 post cópula lo que no sucede en hembras preñadas. (Leyva y García, 1999).

Durante los primeros días posteriores a la ovulación, las hembras pueden mostrar celo debido probablemente a que los niveles de progesterona secretados no son suficientes para ejercer un efecto inhibitorio en el eje hipotálamo – hipofisiario (Leyva y García, 1999). Posteriormente, el día 5 post ovulación, la presencia de un cuerpo lúteo funcional que secreta niveles adecuados de progesterona inhibe el comportamiento de celo (Fernández Baca, 1971) y será el principal soporte de la preñez (Bravo, 2002).

2.1.7.- Inducción de Ovulación

En alpacas y llamas se han demostrado que la ovulación puede ser inducida artificialmente mediante inyecciones de hCG que tiene acción similar a LH o mediante aplicación de GnRH (Fernández Baca *et al.*, 1970; Sumar, 1981). Sumar (1985) logró inducir ovulación con 1 mg de LH, además fue necesaria una dosis de 4.8 mg de GnRH para provocar el estímulo adecuado.

Estudios previos reportan la ocurrencia de ovulación en camellos bactrianos, al depositar semen de camellos en la vagina en ausencia de cópula, sugiriendo la existencia de una sustancia química presente en el semen, con capacidad de inducir la ovulación (Chen *et al.*, 1985)

En llamas inducidas para tener folículos ováricos múltiples mediante la administración de eCG, seguida de la cópula o la aplicación de hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) siendo más eficaz la inducción de la ovulación con eCG que con cópula encontrándose cuerpos lúteos en un porcentaje de 59 % a 78 %.

También se ha comprobado la presencia de un factor inductor de ovulación en el plasma seminal que provoca un incremento en las concentraciones de LH e inducen una respuesta ovulatoria y luteotrópica (Adams *et al.*, 2005).

2.1.8.- Fecundación y Desarrollo Embrionario

Posterior a la cópula, los espermatozoides avanzan las primeras 24 horas hacia la unión útero – tubal, que es el principal reservorio de espermatozoides en alpacas. El transporte del espermatozoide y del ovocito de 15 hembras multíparas fue observado a las 6, 12, 24 y 30 horas después de una sola cópula, observándose que los espermatozoides estuvieron presentes en el sitio de fecundación 6 h después de la cópula y se mantuvieron ahí por mas de 30 h (Bravo *et al.*, 1996).

La fecundación se produce en el oviducto por la presencia de un óvulo y un espermatozoide, luego el óvulo fecundado es transportado al útero aproximadamente a los 6 – 7 días. Después de una exitosa fecundación, el desarrollo embrionario es rápido en camélidos (Tibary, 2001). A los 3 días del servicio los índices de fecundación son mayores al 85% en alpacas hembras (Fernández Baca, 1970). Cuatro días después de la monta, una mórula de 4 – 8 células puede ser encontrada en el oviducto y una mórula compacta a los 7 días. Los embriones entran a la cavidad uterina aproximadamente a los 5 – 6 días después de la ovulación en la división temprana del estado de blastocisto (Del Campo *et al.*, 1995; Mckimon y Tinson, 1992; Tibary, 2001; Tibary y Anouassi, 1997). Los blastocistos se colectaron del cuerno uterino izquierdo 10 días después de la cópula (Bravo *et al.*, 1996). El embrión empieza a alargarse por los días 9 y 10 y el trofoblasto establece contacto cercano con el endometrio por los días 12 de gestación. (Tibary, 2001). La implantación parece iniciarse alrededor del día 14 después de la ovulación como fue descrito en los otros camélidos (Olivera *et al.*, 2003).

En el día 15 de gestación, los blastocitos son completamente libres dentro de la cavidad uterina, iniciándose la implantación alrededor del día 20. En los días 22 y 26 de la gestación, el trofoblasto es adosado a las células epiteliales superficie del útero. Los lugares de implantación ocurren predominantemente en el cuerno uterino izquierdo, pero una ampliación el trofoblasto ocupa también grandes extensiones del cuerno derecho, donde la interacción materno-fetal muestra peculiar áreas de aposición (Olivera *et al.*, 2003).

Los incrementos iniciales de progesterona se pueden detectar en la sangre a los 3 a 4 días, alcanzando un pico a los 8 días post ovulación luego entre los 9 y 11 días se registra una disminución transitoria sugiriéndose que la prostaglandina F2 α estaría involucrada (Fernández Baca, 1993), sin embargo el embrión presente y en desarrollo (Sumar, 1997) produce una señal de reconocimiento maternal de la preñez (Aba *et al.*, 1995). Después de esto los niveles de progesterona se mantienen elevados por encima de 2 ng/ml pero fluctúa durante toda la

gestación excepto las 2 últimas semanas que empiezan a declinar hasta llegado el momento del parto (Bravo *et al.*, 1996; Ridland *et al.*, 1992), siendo marcadamente menor 24 horas antes del parto, y basal el día del parto (Aba, 1998; Leon *et al.*, 1990). Otros no reportaron la disminución gradual en los últimos 15 días de gestación sino más bien un marcado descenso durante las últimas 72 horas antes del parto (Raggi *et al.*, 1999).

La tasa de concepción y el mantenimiento de la preñez se ven afectados por el peso de la hembra al momento del emparejamiento (Sumar, 1999). En alpacas y llamas la localización del feto ocurre en el cuerno uterino izquierdo, esto a pesar de que la actividad ovulatoria es similar en ambos ovarios.

2.1.9.- Ultrasonografía en Reproducción

La importancia del ultrasonido para mejorar la eficiencia reproductiva en diferentes animales domésticos ha sido claramente establecida en estudios sobre la estructura y función de las gónadas y las características del tracto reproductivo (Bourke *et al.*, 1992; Bravo *et al.*, 1993), el control del momento de ovulación (Bravo *et al.*, 1991), la detección temprana de preñez (Bukrell *et al.*, 1986; García *et al.*, 1993), la evaluación del crecimiento fetal relacionada con la edad de gestación (White *et al.*, 1985), la detección de la pérdida embrionaria y la muerte fetal o la momificación (Bourke *et al.*, 1992).

Los estudios de ultrasonido muestran un estroma ovárico ecogénico, donde los folículos están dispuestos a lo largo de la periferia del ovario, protruyendo claramente de la superficie ovárica aquellos folículos grandes y el cuerpo lúteo (Adams *et al.*, 1989). Los folículos ≥ 4 mm producen imágenes no ecogénicas redondeadas y negras (Sumar, 1989). El folículo preovulatorio previamente crece en una proporción promedio de 0.7 mm/día, considerándose ocurrida la ovulación 1.8 días después de la monta (Adams *et al.*, 1989).

La visualización del cuerpo lúteo por ultrasonografía transrectal es relativamente fácil a los 4 días después de la ovulación (Sumar, 1989). En general, el cuerpo lúteo se observa como una estructura hipoecogénica con núcleo central más ecogénico (Adams *et al.*, 1989).

La ultrasonografía transrectal es una herramienta muy valiosa para la detección de preñez temprana en alpacas y llamas. Se ha encontrado que esta técnica es fácilmente aplicable sin riesgos significativos para los camélidos sudamericanos domésticos. Los resultados mostraron que la detección de preñez en alpacas puede realizarse 9 días después de la monta, alcanzando

un 100% de exactitud a los 23 días. Los resultados mostraron que a los 9 días de gestación, saco gestacional alcanza 0.6 cm de diámetro y a los 23 días de gestación el saco gestacional puede medir 1.00 ± 0.14 cm de diámetro (Parraguez *et al.*, 1997).

El fluido asociado con gestación se detecta en el lumen uterino a los 14 días en un 100 % de alpacas (Sumar, 1989), observándose la vesícula embrionaria simple en el cuerno izquierdo (Adams *et al.*, 1989) alrededor del día 12 post cópula en alpacas (Bravo *et al.*, 2000).

A partir de los 30 días de gestación se observa los latidos cardiacos y el cordón umbilical; y a los 45 días de gestación se detecta con mayor rapidez el útero conteniendo abundante líquido alantoico y el embrión propiamente dicho (Sumar, 1989).

2.2.- Fisiología reproductiva en el macho

2.2.1.- Bases Anatómicas

Prepucio.- El prepucio está ubicado en la región inguinal, es de forma triangular cuando es vista lateralmente y aplanado de lado a lado. El prepucio se adhiere al glande del pene hasta 2 o 3 años de edad haciendo de la protrusión del pene imposible en jóvenes animales (Fowler y Bravo, 1998). En ausencia de estímulo sexual, el pequeño orificio prepucial se dirige caudalmente (Jonson, 1989). El prepucio tiene bien desarrollado el aparato muscular, conformado del músculo craneal, lateral y caudal (Fowler, 1998; Tibary y Anouassi, 1997). Estos músculos permiten el movimiento craneal del orificio prepucial durante la erección y el comportamiento de cópula.

Pene.- El pene del camélido es fibroelástico y su longitud varía desde 35 a 45 cm en llamas y alpacas. El pene es cilíndrico, gradualmente disminuye en diámetro desde su base hasta el arco isquiático (1.2 – 2 cm en la llama) al cuello del glande del pene (Fowler, 1998; Tibary y Anouassi, 1997). En ausencia de erección, el pene es retraído observándose la flexura sigmoidea (Smith *et al.*, 1994).

El pene está conformado por la base, el cuerpo, el extremo libre y el glande. La base del pene es aplanada dorsoventralmente y muestra un segmento transversal elíptico a este nivel. El glande del pene es largo (9 – 12 cm) y el extremo distal consiste de un proceso cartilaginoso que tiene una curvatura hacia la derecha (Bravo y Jonson, 1994). La última porción de la uretra se localiza en la base del proceso cartilaginoso no en la punta. (Bravo y Jonson, 1994). La curvatura natural del proceso cartilaginoso del pene del camélido permite la penetración a los anillos cervicales (Johnson, 1989), a través de combinar movimientos de rotación y empuje y la deposición y dispersión intrauterina del semen (Smith, 1999).

Testículos.- Los testículos tienen forma ovoide y redondeada, un peso de 18 g y miden de 3.5 – 4.5 cm de largo y 2 – 3 cm de ancho (Novoa y Leyva, 1996). Se encuentran, en número par, situados en el tercio anterior de la región perianal sujetos por el escroto y el cordón espermático (Alanocca, 1978). En alpacas el escroto es no penduloso (cuello pequeño) y está situado a nivel del arco isquiático. Los testículos son relativamente pequeños, están presentes en el escroto al nacimiento, normalmente son suaves y difíciles a la palpación. (Fowler, 1998; Sumar 1985). La túnica dartos y el músculo cremaster interno cumplen una función

termorreguladora acomodando a los testículos en respuesta a las variaciones de la piel del escroto (Vaughan *et al.*, 2003).

La variación del tamaño de los testículos está relacionada a la edad (Galloway, 2000; Smith *et al.*, 1994) y a la estación (ElWishy, 1988; Fowler y Bravo, 1998). ElWishy (1988) observó que en la estación reproductiva, el peso testicular aumentaba debido al desarrollo intersticial del tejido y al incremento del diámetro de los túbulos seminíferos.

Epidídimo.- El epidídimo es un órgano pequeño, tiene forma de jota y está fuertemente adherido al testículo (Smith, 1999). El epidídimo está conformado de 3 partes: cabeza, cuerpo y cola (Novoa y Leyva, 1996). La cabeza del epidídimo es más larga que la cola (Bravo *et al.*, 1995) y se sitúa craneoventralmente a su respectivo testículo, el cuerpo se extiende en sentido medial y dorsocaudalmente a la cola que se encuentra dorsal al testículo (Fowler, 1998).

Luego de ser producidos en los testículos, los espermatozoides llegan a la cabeza y al cuerpo del epidídimo para su maduración y posteriormente a la cola del epidídimo donde se almacenan (Barde y Fuquay, 1992; ElWishy, 1988).

Glándulas sexuales accesorias.- La próstata es normalmente descrita como una pequeña glándula en forma de H (3 cm x 3cm x 2 cm) firmemente pegada a la cara dorsolateral de la uretra pélvica cerca del triángulo de la vejiga (Bravo y Johnson, 1994; Fowler, 1998). Su cara ventral es ligeramente cóncava. Numerosos conductos prostáticos dirigen la secreción de esta glándula directamente en el saco seminal.

Las 2 glándulas bulbouretrales son ovoides y se ubican en la cara dorsolateral de la uretra pélvica y craneal al arco isquiático. Estas glándulas miden aproximadamente 2 cm de diámetro en la llama adulta y están parcialmente cubiertas por el músculo bulbocavernoso (Fowler, 1998; Smith *et al.*, 1994; Sumar, 1983; Sumar y García, 1986; Tibary y Anouassi, 1997).

Una característica notable en la anatomía de los genitales internos de los camélidos, es la ausencia de la vesícula seminal (Tibary y Anouassi, 1997).

2.2.2.- Pubertad

Se define pubertad como la edad en la cual el macho es capaz de liberar gametos y mostrar un comportamiento sexual (Hafez, 2002). La edad de la pubertad es variable y es

influenciada por factores genéticos, nutrición, cambios climáticos y la estación reproductiva. Las llamas y alpacas machos pueden mostrar comportamiento sexual a una edad temprana (< 1 año) (Escobar, 1984; Fowler, 1998; Sumar, 1985). Sin embargo la completa erección y la penetración es solo posible cuando el pene esta completamente liberado de sus adherencias prepuciales.

Al momento del nacimiento la alpaca posee un pene completamente adherido al prepucio por un tejido embrionario; al año de edad solo un 8 – 10 % de alpacas se ha liberado de la adherencia pene-prepucial, mientras que a los 2 años el 70 % ya esta libre de adherencias pene-prepuciales y a los 3 años, entre el 95 – 100% de machos obtienen un pene totalmente libre del prepucio (Bustinza, 2001; Novoa y Leyva, 1996; Losno y Coyutupa, 1981; Chuna *et al.*, 1999). El proceso del desprendimiento del prepucio normalmente empieza a los 12 o 13 meses de edad y coincide con el aumento de la concentración de testosterona plasmática (Bravo y Jonson, 1994). Cuando los machos llegan a la madurez sexual, los testículos crecen y los niveles de testosterona se incrementan más de 1000 pg / ml a una edad aproximada de 20 meses en la mayoría de alpacas (Bravo ,1995; Bravo, 2002).

El peso promedio de una alpaca macho al momento de la liberación pene-prepucial fue de 70.1 Kg. y a una edad de 21.5 meses de edad (Sumar, 1988). La variación en la edad en la que la adherencia pene-prepucial se pierde puede explicarse en parte por el plano de la nutrición (Fernández Baca, 1993) como existe una correlación entre el tamaño corporal y la longitud media de los testículos (Galloway, 2000). La amplia variación en el tamaño testicular a alguna edad o tamaño testicular sugiere que otros factores, probablemente genéticos son también importantes (Galloway, 2000).

La aparición de una luz en los túbulos seminíferos y la presencia de espermatozoides fueron reportadas a los 12 y 18 meses de edad respectivamente (Montalvo *et al.*, 1979). Otros autores han reportado que la producción espermática empieza a una edad temprana como a los 10 – 12 meses de edad en algunos machos y normalmente se presenta a 1.5 – 2 años de edad (Smith *et al.*, 1994). El crecimiento testicular en estas especies es lento y el máximo tamaño no se alcanza hasta los 3 años de edad (Bravo y Johnson, 1994). De acuerdo a Johnson (1989), la llama macho no madura hasta los 2.5 a 3 años de edad pero las gestaciones son el resultado de empadres de machos jóvenes como los de 6 meses.

Las alpacas machos alcanzan la madurez sexual a los 5 años de edad correspondiente a los 62.5 Kg donde los testículos deben medir al menos 4 – 5 cm de largo y 2.5 – 3 cm de ancho (Galloway, 2000; Sumar, 1996).

2.2.3.- Comportamiento sexual

El deseo de copular o libido se debe a la testosterona, desde que la castración resulta en pérdida de la conducta sexual específica; esta pérdida puede ser incompleta si la castración se realiza en adultos, lo que indicaría que la experiencia previa influye en la expresión de la conducta. También se indica que la capacidad de efectuar la cópula varía en cada individuo, probablemente debido a factores genéticos. (Novoa y Leyva, 1996).

Cuando el macho es introducido en un rebaño de hembras, persigue a una hembra para luego montarla no siendo tan importante las señales olfativas al ser débilmente perceptible por los camélidos machos, sino más bien la indicación visual donde la hembra receptiva adopta la posición de cópula. El macho se aproxima y se sienta sobre ella, luego busca lograr la intromisión del pene con suaves movimientos pélvicos ya sea de aproximación y retiro y también de extensión y aproximación, facilitando así la introducción del pene por los labios vaginales. Durante la cópula el macho emite sonidos guturales o ronquidos donde infla los carrillos que parece constituir una señal o estímulo para las hembras, muchas de las cuales al acercarse a la pareja en cópula adoptan una posición recumbente (Fernández Baca, 1991). Durante la cópula, el macho penetra la cervix con su pene, y deposita el semen durante múltiples eyaculaciones dentro de ambos cuernos uterinos usando leves movimientos de empuje (Bravo, 1994; Franco et al., 1981). El movimiento del pene dentro del útero durante la cópula puede causar inflamación, edema e hiperemia del endometrio (Bravo et al., 1996, Velásquez *et al.*, 1999)

La cópula normalmente dura 20 – 25 minutos, con un rango de 5 a 65 minutos (England *et al.*, 1971; Fernández Baca *et al.*, 1970; Vaughan *et al.*, 2003). La cópula puede durar 8.1 ± 5.4 minutos en empadre libre, y $17.5 + 12.1$ minutos en empadre controlado con un solo macho (Novoa y Leyva, 1996). El tiempo de cópula es determinado por el macho y está influenciado por la edad, raza, estación, frecuencia (Tibary, 1999) y por la presencia de otros animales (England, 1971). Bravo *et al.* (1997) observó que realizando 2 – 4 montas al día alcanzaron una tasa de preñez de 77 % mientras que aquellos que se cruzaron 6 veces al día alcanzaron 59 % de tasa de preñez. Se sugiere que las tasas disminuyeron en respuesta a un agotamiento de reservas espermáticas.

En un estudio la primera monta del día fue de 22.7 ± 1.1 minutos de duración, siendo significativamente mayor que la segunda monta la cual duró 14.8 ± 1.6 minutos, sin embargo no hubo diferencia en la tasa de preñez de la primera y segunda monta (Vaughan, 2001).

Para minimizar el número de montas por concepción se ha recomendado seleccionar los machos con un tamaño testicular grande con el supuesto que existe relación directa entre el tamaño testicular y la producción espermática en animales de ganado doméstico puede ocurrir en camélidos. (Sumar, 1983; Smith, 1999; Brown, 2000; Galloway, 2000).

Cuando las alpacas machos son separadas de las hembras como una práctica de manejo, las concentraciones de testosterona son 3900 pg / ml comparado con 900 y 1200 pg / ml en la época reproductiva. En Estados Unidos, donde los machos se aparean todo el año, la testosterona plasmática fluctúa entre 900 y 1200 pg / ml durante todo el año (Fowler *et al.*, 1998). Varios estudios han mostrado que las montas son más largas en otoño que en primavera (England *et al.*, 1971; Knight *et al.*, 1992; Pollard *et al.*, 1995)

2.2.4.- Espermatogénesis

La espermatogénesis se produce durante todo el año en todos los camélidos, pero el efecto de la estación en la producción de espermatozoides (semen) es poco conocida. Las variaciones estacionales en la producción se basan en el origen geográfico, manejo de los animales, la extensión de la estructura social y domesticación en los camélidos (Novoa, 1970; ElWishy, 1988; McEvoy *et al.*, 1994).

Un efecto de la temporada en la producción de semen se ha informado en llamas con alta concentración espermática en otoño y una baja producción espermática en el verano (Gauly, 1997). Existe variación en las concentraciones de testosterona plasmática en alpacas machos debido a los cambios estacionales, obteniéndose el promedio más alto al final del verano y el más bajo en invierno (Losno y Coyotupa, 1979; Urquieta *et al.*, 1994).

El tránsito del espermatozoide por el epidídimo está asociado con un cambio en la posición de la gota citoplasmática que se vuelve distal pero sigue presente en más de 60% de los espermatozoides en el segmento terminal. La gota citoplasmática se pierde cuando un espermatozoide llega al conducto deferente (Delhon y Von Lawzewitsch, 1994). Hay una disminución en el porcentaje de espermatozoides anormales (con dobleces a la mitad del cuerpo y en la cola) durante el tránsito por el epidídimo. La producción de semen está correlacionada

con el tamaño testicular en camélidos sudamericanos. La longitud promedio testicular está correlacionada con el peso testicular (Galloway, 2000) y puede ser utilizado como un simple medio de evaluar el tamaño testicular en alpacas. La longitud testicular puede ser utilizada para estimar la probabilidad de la producción espermática en alpacas (Galloway, 2000)

2.2.5.- Control endocrino de la espermatogénesis

Una correcta integración del eje hipotálamo – hipófisis – gónadas es el elemento imprescindible para la expresión reproductiva. La función testicular está directamente influenciada por las hormonas gonadotropas, las que a su vez son gobernadas por la secreción pulsátil de la GnRH del hipotálamo (Hafez, 1992).

A consecuencia del estímulo de la GnRH sobre la hipófisis, esta inicia la descarga pulsátil de la hormona luteinizante (LH) y la producción de la hormona folículo estimulante (FSH) (Illera, 1994). La LH estimula las células intersticiales de Leydig para la producción y la liberación de andrógenos, principalmente testosterona (Vaughan *et al.*, 2003); este da origen a los caracteres sexuales secundarios del macho, promueve el desarrollo y mantenimiento del aparato reproductor masculino, estimula los estados tardíos de la espermatogénesis y prolonga el lapso de la vida del espermatozoide en el epidídimo. Los andrógenos producidos también se difunden hacia las células de Sertoli adyacentes y hacia la sangre, donde ejercen retroalimentación negativa tanto en el hipotálamo como en la hipófisis para bloquear la liberación de LH adicional (Hafez *et al.*, 2002).

La FSH interactúa con receptores ubicados en las células de Sertoli, estimula la espermatogénesis y la producción de la Proteína de unión de Andrógenos (ABP). La inhibina tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la FSH, mas no sobre la LH (Hafez *et al.*, 2002).

2.2.6.- Características del semen de camélidos

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los gametos del macho (los espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor (Garner y Hafez, 2002). Las características físicas y biológicas del semen de los camélidos sudamericanos son muy variables dependiendo de las condiciones de la colección (por ejemplo métodos de colección, temperatura del medio ambiente, fecundidad y libido de machos). En la alpaca, el

plasma seminal constituye 88.5% del volumen del semen y espermatozoides 11.5 %, sin diferencias significativas entre edades (Garnica *et al.*, 1993).

Generalmente el eyaculado individual contiene poco volumen, alta viscosidad del semen conteniendo una escasa concentración espermática. El eyaculado tiende a ser no fraccionado (Sumar 1983), pero algunos parámetros (por ejemplo la concentración, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides normales) pueden variar ligeramente desde el inicio hasta el final del eyaculado (Bravo *et al.*, 2002; Lichtenwalner *et al.*, 1996a, 1996b).

En un estudio, Bravo (1997a) determinó que los cambios en las características de semen ocurren más a menudo en el tercer eyaculado, donde la concentración espermática y el porcentaje de colas anormales fueron más afectadas que la motilidad, volumen o porcentajes de espermatozoides vivos o cabezas anormales. Tiene una alta viscosidad característica que le da un aspecto semejante a un gel y que dificulta su manejo (Garnica *et al.*, 1993).

El volumen de semen, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides normales y duración de la cópula varía entre alpacas machos, sin embargo la oscilación y el pH no se diferencian (Bravo, 1997a).

Color y aspecto.- El semen es usualmente descrito de un color blanco claro o lechoso (Garnica *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 1997) dependiendo de la concentración espermática y la proporción de la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Tibary *et al.*, 1999). Es predominantemente blanco lechoso si es colectado por electroeyaculación (Fernández Baca y Calderón, 1966) o por vagina artificial (Garnica *et al.*, 1993; Quispe, 1987) pero a veces puede ser blanco cremoso (Garnica *et al.*, 1993). El eyaculado individual puede ser heterogéneo con un material translúcido combinado con áreas oscuras.

El semen colectado por aspiración de la vagina contiene cantidades variables de sangre como resultado del trauma al tracto reproductivo de la hembra. La hemorragia puede ser secundaria a la copulación y penetración de la cervix por el pene. La presencia de glóbulos rojos no parece dañar la calidad del semen como en otras especies (Tibary, 2003).

pH.- El pH del semen de alpaca es ligeramente alcalino con un promedio de 7.29 y rango de 7.29 a 8.6. La frecuencia de eyaculados no tiene efecto significativo sobre el valor de pH (Mogrovejo, 1952; Fernández Baca y Calderón, 1966; Galindo, 1995).

Concentración espermática.- La concentración espermática es muy variable (82 – 250 millones de espermatozoides / ml) y se ve afectada por la edad, el método de colección y el rango de eyaculación. La interrupción de la cópula resulta en concentraciones reducidas del eyaculado (Bravo *et al.*, 2002). Al respecto de la concentración, esta también muestra un influjo de la técnica de colección, siendo la vagina artificial el método de colección más usado y confiable con valores alrededor 100 millones de espermatozoides por ml (Sumar y Leyva, 1981; Bravo *et al.*, 1997; Aller *et al.*, 2003; Raymundo *et al.*, 2006; Santiani *et al.*, 2002); sin embargo, debemos considerar que se han reportado concentraciones espermáticas mayores, al usar una hembra en celo como estímulo para el macho donante sometido a colecta por vagina artificial (Dávalos y Olazábal, 2002).

Volumen.- El volumen promedio de cada eyaculado de alpaca es de 1 – 2 ml y los rangos oscilan desde 0.4 a 12.5 ml (Fernández Baca y Calderón, 1966; Garnica *et al.*, 1993, Quispe, 1987; Sumar y Leyva, 1981). El volumen de eyaculado es variable y, al igual que la concentración espermática, está influenciado por el método de colección empleado (Garnica *et al.*, 1995; Sumar y Leyva, 1981). En las alpacas los eyaculados obtenidos por vagina artificial tienden a disminuir en volumen cuando se incrementa la frecuencia de uso. En eyaculaciones sucesivas, el volumen del último eyaculado es significativamente menor (Bravo *et al.*, 1997).

Motilidad.- La motilidad progresiva como se describe en otras especies, es muy difícil de apreciar en semen de camélidos debido a la naturaleza viscosa del semen. La motilidad espermática es muy escasa en el semen sin diluir, y se describe mejor como oscilatorio. Solo el 5-10% de los espermatozoides progresan activamente hacia delante (Neely, 1993; Bravo *et al.*, 1997). Los espermatozoides aumentan su motilidad progresiva cuando el eyaculado se vuelve más líquido (Tibary *et al.*, 1999). La determinación de la motilidad es una de las pruebas más utilizadas en la valoración de la calidad del semen. Una fuerte y progresiva motilidad es un índice importante de la viabilidad de la población espermática. A pesar que la motilidad se puede medir con la ayuda de aparatos, normalmente se hace de forma subjetiva, mediante el examen microscópico realizado por un técnico experimentado (Sorensen, 1991; Illera, 1994).

La actividad masal del semen del camélido puede ser observada en un eyaculado no diluido si la concentración espermática es suficientemente alta (Tibary y Anouassi, 1997) y puede ser clasificada de acuerdo a la intensidad del movimiento giratorio (Garnica *et al.*, 1993).

Las muestras deben ser evaluadas tan pronto como sea posible, considerando la influencia que tienen los cambios de temperatura sobre la motilidad espermática. La técnica consiste en la

observación microscópica (400x) de una muestra de semen diluida en una lámina portaobjetos temperada; los espermatozoides aparecen activos con movimiento progresivo y se les puede ver momentáneamente individualizados. Se determina el porcentaje de espermatozoides móviles sobre el total de espermatozoides visualizados (Arthur *et al.*, 1991; Sorensen, 1991; Ax, 2002).

La ausencia de motilidad se encuentra en casos de orquitis y epididimitis, mientras que en los casos de hipoplasia y degeneración testicular la motilidad espermática puede ser muy variable (Arthur *et al.*, 1991).

En el caso de semen de camélidos sudamericanos, debido a la característica viscosa del semen, no se aprecia la motilidad masal y la motilidad espermática es estacionaria y no progresiva (Bravo *et al.*, 2002).

Viscosidad.- Uno de las más importantes características físicas del semen de camélidos es su alta viscosidad que hace muy difícil su manejo durante los procedimientos y combinaciones con los dilutores (Garnica *et al* 1993; Merlian *et al.*, 1986; Tibary y Anouassi, 1997; Tibary y Pugh, 2003; Vaughan *et al.*, 2003). La viscosidad del semen se atribuye a la presencia de mucopolisacáridos de las secreciones de la glándula bulbouretral de la próstata (Garnica *et al.*, 1993). El rol fisiológico de esta característica no es claro. El grado de viscosidad depende del macho individualmente en la proporción del fluido seminal gelatinoso y tiende a disminuir con el incremento del número de eyaculados en un día. Se observó que la viscosidad del semen de alpaca colectado por vagina artificial tiende a disminuir en el tercer eyaculado (Bravo *et al.*, 1997). La licuefacción completa del semen de alpaca toma varias horas. En un estudio, el tiempo medio para la licuefacción del semen de alpaca fue de 23 ± 1.2 h (rango de 8-48 h) (Garnica *et al.*, 1993; Leyva *et al.*, 1984). La licuefacción del semen se ha obtenido por exposición a varias enzimas hidrolíticas y proteolíticas (tripsina, colagenasa, fibrolisina, hialuronidasa). Todas estas enzimas son efectivas pero pueden causar daño al espermatozoide si la incubación es prolongada o la concentración es muy alta. Una solución de tripsina de 1: 250 parece ser más efectiva con efectos negativo mínimos en los espermatozoides (Bravo *et al.*, 1999).

La alta viscosidad del plasma seminal así como la baja concentración espermática determinan patrones de motilidad particulares para el semen de alpaca, en comparación con otras especies no existe motilidad masal y la motilidad individual es estacionaria u oscilante y no progresiva. Diferentes autores registran variados valores para la motilidad contando con un promedio de 52.4 % y rango de 30.6 – 80. 0 % (Sumar y Leyva, 1981; Bravo *et al.*, 2002;

Dávalos y Olazábal, 2002; Quintano, 2002) midiendo la distancia de un volumen conocido de semen que se dibuja hacia arriba de un portaobjetos de vidrio con una pipeta.

2.2.7.- Bioquímica del plasma seminal

El análisis bioquímico del plasma seminal fue realizado después de la colección de semen usando vagina artificial y de centrifugar el semen a 700 g durante 20 minutos, encontrándose los siguientes componentes bioquímicos. Del volumen eyaculado el 88.5 % contiene plasma seminal y el 11.5 % restante está constituido por los espermatozoides. (Garnica *et al.*, 1993).

La glucosa sirve como la principal fuente de energía para el espermatozoide siendo las concentraciones más altas en animales jóvenes que en adultos (Garnica *et al.*, 1993). Los lípidos y fosfolípidos son substratos para la maduración espermática y los valores reportados en alpacas coinciden con los resultados de otras especies incluido el camello dromedario. (Garnica *et al.*, 1993).

Cuadro 1.- Componentes bioquímicos del plasma seminal de llamas y alpacas

Componentes	Unidad	Llama Adulta	Alpaca 3 años	Alpaca 6 años	Rango	Camello Bactriano
Ácido cítrico	mg / dL		4.3 ± 0.3			
Cloro	mg / dL	402 ± 10	348 ± 32	404 ± 34	263 ± 91	173 ± 59
Calcio	mg / dL		19 ± 1	18 ± 3		13 ± 5
Fósforo inorgánico	mg / dL	10	12 ± 2	0.8 ± 0.4	0.7 ± 17	13 ± 1
Glucosa	mg / dL	6 ± 0.3	7 ± 0.4	5 ± 0.3		12 ± 10
Fructosa	mg / dL	4 ± 0.2		6 ± 0.1		
Lípidos	mg / dL	106 ± 5	86 ± 10	95 ± 10		
Fosfolípidos	mg / dL		29 ± 0.1	29 ± 0.1	27 ± 31	
Nitrógeno Total	mg / dL	623 ± 23	548 ± 50	647 ± 32	308 ± 697	
Proteínas totales	g / dL	4 ± 0.1	3 ± 0.3	4 ± 0.2		
Albumina	g / dL		2 ± 0.3	2 ± 0.2		
Globulinas	g / dL	1 ± 0.1	2 ± 0.2	1 ± 0.3		

(Garnica *et al.*, 1993; 1995)

La composición bioquímica del semen del camélido es similar a la reportada para otras especies de ganado doméstico. El cloro es el principal anión y el calcio el principal catión (Garnica *et al.*, 1993). Estos electrolitos pueden ser de importancia en procesos fisiológicos del espermatozoide como la motilidad y la capacitación. La glucosa se encontró en altas concentraciones en el plasma seminal de camélidos y pueden ser el principal sustrato para la energía (Garnica *et al.*, 1993). Las concentraciones de glucosa son más altas en animales más jóvenes que en alpacas machos adultos. (Garnica *et al.*, 1993,1995). Otros componentes del semen como los lípidos, fosfolípidos y las proteínas han sido cuantificados en el plasma seminal de alpaca (Garnica *et al.*, 1993). Sus funciones todavía no han sido estudiadas en camélidos, pero puede jugar un rol en la maduración y protección de la integridad de la membrana celular del espermatozoide.

Las proteínas dan protección a los espermatozoides contra los efectos nocivos de mucha dilución (Garnica *et al.*, 1993). La información de los camellos bactrianos y alpacas indican que el semen del camélido contiene un factor que induce a la ovulación. El plasma seminal indujo la ovulación en hembras tras la colocación dentro de la vagina o el útero sin monta (Chen *et al.*, 1985; Ríos *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1985; Sumar, 1994) o vía inyección intramuscular (Chen *et al.*, 1985; Pan *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 2005, López *et al.*, 2006). La composición bioquímica del factor es desconocida (Ríos *et al.*, 1985) pero es diferente de GnRH (Zhao *et al.*, 1992; Paolicchi *et al.*, 1999). El comportamiento de monta tiene algún efecto aumentativo en las ovulaciones inducidas por semen (Fernández Baca *et al.*, 1970; Chen *et al.*, 1985). Contrario a estos resultados, Anouassi *et al.*, (1992) encontró que aunque la inseminación del semen completo indujo la ovulación en algunos camellos dromedarios, la ovulación y tasas de gestaciones fueron significativamente más altos en aquellos artificialmente inseminados y montados por machos vasectomizados.

2.2.8.- Plasma seminal como inductor de ovulación

En un estudio, Chen *et al.* (1985) determinó que la ovulación en camellos bactrianos no es espontánea y es inducida por semen, pero no por espermatozoides, alcanzando una tasa de ovulación de 87% después de la inseminación intravaginal; demostrándose así la existencia de un factor de inducción de ovulación (FIO) en el plasma seminal del camello bactriano el cual también puede estar presente en el toro. Se presume que la absorción de este factor es muy rápida y se realiza en la vagina o en el útero debido a que 1 de 4 hembras ovuló después de un lavado de la vagina.

Al encontrar ese Factor de Inducción de Ovulación en camellos bactrianos se sugirió que también podría estar presente en el semen de camélidos sudamericanos debido a la relación filogenética. Para afirmar esta posibilidad, Ríos (1985) inseminó intravaginalmente, depositando 2 ml de semen de toro, 2ml de semen de alpaca y 2ml de plasma, induciendo la ovulación en un 53%, 66.7% y 7.6% respectivamente. También se encontró una tasa ovulatoria de 7.6 % con plasma seminal de machos vasectomizados que sugirió la existencia de un factor inductor de la ovulación en el semen de alpaca y toro mas no en el plasma seminal de machos vasectomizados, pero sí probablemente en el plasma seminal de machos enteros. Además no se produjo ninguna ovulación cuando depositó dentro de la vagina 2 ml de GnRH (0.008 mg), pero si se produjo ovulación en casi todos cuando se inyectó 2 ml de hCG (1000UI) o GnRH (0.008mg) (Ríos, 1985).

En camellas bactrianas (*Camelus bactrianus*) se analizaron las concentraciones hormonales antes y después de inducir la ovulación mediante monta natural o semen causando una oleada de LH después de 4 horas de realizada la inducción y un tiempo de ovulación de 30 – 48 horas. (Xu *et al.*, 1985).

López (2006) luego de administrar vía intramuscular 2 ml plasma seminal de llamas y alpacas alcanzó una tasa de ovulación del 100% y en los animales tratados con plasma seminal de toro fue de 25 %. Estas diferencias podrían deberse a la menor concentración de estos factores en el plasma seminal de los bovinos, posiblemente por la presencia de la vesícula seminal presente en esta especie. Cabe la posibilidad que este factor no se forme en esta glándula, que algún componente secretado por ésta bloquee su efecto, o se deba a las características físicas propias del plasma seminal de los bovinos.

Uno de los más importantes descubrimientos en este estudio fue la potencia del efecto del tratamiento con plasma seminal. A pesar de la escasa dosis usada, los efectos del plasma seminal fueron profundos. Colectivamente, 28 de 30 (98%) de las alpacas y llamas a que se les administró plasma seminal intramuscularmente ovularon, comparadas con 5 de 6 (83%) a quienes se les había administrado GnRH y 0 de 20 (0%) que se les aplicó PBS. La duración de la oleada de la concentración plasmática de LH fue significativamente mayor después del tratamiento con plasma seminal que con GnRH, y la posterior secreción de progesterona del cuerpo lúteo fue el doble que del grupo de GnRH.

La hipótesis de que el FIO y la GnRH afectan la liberación de LH de la hipófisis de modo diferente y son moléculas diferentes se comprobó, debido a que las concentraciones de LH

permanecieron elevadas por 8 horas en el grupo del plasma seminal a diferencia del grupo tratado con GnRH que había retornado a los niveles basales 5.5 horas después del tratamiento (Adams, 2005).

Pan *et al.*, (2001) demostraron la existencia de proteínas asociadas a la liberación de LH en el plasma seminal. El factor de ovulación es común en camellos y es completamente diferente de la forma nativa de LHRH, LH, HCG, PMSG y PGF-2alfa y tiene una bioactividad similar al GnRH.

Paolicchi *et al.* (1999) aplicó plasma seminal de alpacas machos a células gonodotropas hipofisarias provocando la secreción de LH, sin embargo este efecto no sería causado por GnRH sino por un factor similar a este, ya que cuando se expusieron células al plasma seminal junto con un anti GnRH no modificó la secreción de LH. Como consecuencia el factor presente en el plasma seminal de alpacas machos puede inducir la ovulación en hembras de la especie.

El plasma seminal de llamas contiene un factor inductor de ovulación de un peso molecular mayor a 30 kDa, capaz de inducir ovulación en el 100% de los animales tratados con esta fracción. (Vásquez, 2008)

La absorción del factor inductor de ovulación (FIO) del plasma seminal es vía sistémica, como lo demuestra la administración intramuscular y que los diferentes grados de absorción del FIO con la administración intrauterina sin curetaje facilitarían la absorción del FIO incrementando el efecto ovulatorio del plasma seminal (Pánez, 2009).

2.2.9.- Inseminación Artificial

La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva ampliamente utilizada en diversas especies domésticas, por la cual el semen previamente procesado es depositado por el hombre, en el aparato reproductor de la hembra en el momento oportuno. La deposición intrauterina de semen es realizada por la inserción de una pipeta a través de la cérvix en una forma similar la utilizada para la IA de ganado bovino o con la ayuda de un vaginoscopio.

Diversos métodos han sido utilizados para la recolección de semen en camélidos sudamericanos, tales como fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), electroeyaculación (Fernández Baca y Calderón, 1966) y vagina artificial (VA) con un maniquí de alpaca (Sumar, 1991).

El uso de una vagina artificial, similar a la usada en ovinos, fue reportado en 1981. La vagina artificial fue colocada dentro de un maniquí que los machos fueron entrenados a montar. La técnica se mejoró con el uso de una mantilla eléctrica alrededor de la VA. Una alternativa a la monta de un maniquí es el uso de una hembra receptiva, el pene del macho puede ser dirigido dentro de una vagina artificial durante la monta. La desventaja de la colección de semen con una vagina artificial es que los machos deben ser entrenados para usar la VA, sin embargo resultados consistentes pueden ser obtenidos una vez que los machos se acostumbren a la VA con el maniquí o monta natural (Leyva *et al.*, 1981).

De todas las metodologías, la vagina artificial es la técnica más utilizada en el presente (Garnica *et al.*, 1993) favorecida por la utilización de hembras naturalmente receptivas (Aller *et al.*, 1997a). A pesar que los primeros informes de IA provienen de la década del 60 (Fernández-Baca y Novoa, 1968), la técnica no ha sido suficientemente desarrollada hasta el presente como para ser utilizada a mayor escala, pero algunos ensayos con semen fresco han demostrado obtener una aceptable tasa de gestación (De la Vega y Pérez, 1996; Aller *et al.*, 1997b; Bravo *et al.*, 1997, 1999).

Los primeros ensayos de IA en camélidos sudamericanos se reportaron en 42 alpacas hembras y resultaron en el nacimiento de una sola cría (Fernández Baca y Novoa, 1968). En otro estudio en alpacas, los embriones fueron colectados post mortem por lavado de oviducto en 75% de las hembras cuando fueron inseminadas entre 35 y 45 horas después de la inducción de ovulación (Calderón *et al.*, 1968). Un 38% de tasa de preñez usando semen de vicuña o pacovicuña fue reportado en alpacas y llamas hembras donde la ovulación fue inducida por la monta con machos vasectomizados o tratamiento de hCG (Leyva *et al.*, 1981).

Más recientemente, una tasa media de concepción de 68% fue obtenida en alpacas usando semen entero. La tasa de concepción no fue significativamente diferente entre la inseminación transcervical (67 %) y la laparoscópica (73 %) (Bravo *et al.*, 1997).

En otro estudio (Bravo *et al.*, 1999), el semen de alpaca fue tratado con diferentes enzimas en un intento de licuar el coágulo seminal. La viabilidad espermática fue afectada adversamente por la fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina, pero la colagenasa parece no tener efecto perjudicial en los espermatozoides y efectivamente redujo la viscosidad del semen. El semen fresco tratado con estas enzimas se usó para la IA a diferentes dosis de concentraciones espermáticas la tasa de preñez fue mejor usando una dosis de 12 millones (61 %) y 8 millones (67 %) espermatozoides por ml que 4 millones (53 %).

Se han realizado intentos para congelar el semen de llama usando glycerol / buffer de yema de huevo (Gram *et al.*, 1978; McEvoy *et al.*, 1992) y Tris y EDTA (Baer *et al.*, 1999); sin embargo la sobrevivencia después de la congelación es muy baja y hasta la fecha no ha sido reportada ninguna cría.

Los programas de IA son esenciales para mejorar genéticamente los Camélidos Sudamericanos. Esto podría dar paso a nuevas oportunidades para aplicar esta biotecnología a especies silvestres como la vicuña y el guanaco.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

Las actividades experimentales fueron desarrolladas en dos zonas: un primer estudio se desarrolló en la comunidad de Umpuco, ubicado a 4000 m.s.n.m, en el distrito de Palca, provincia de Lampa, departamento de Puno, a 15° 21' de latitud sur y a 70° 22' de longitud Oeste, entre los meses de Enero y Abril del 2009. El segundo estudio se llevó a cabo en la Estación Experimental Quimsachata – INIA Puno.

3.2. Unidades Experimentales

Se utilizaron un total de 74 alpacas, distribuidas de la siguiente manera. En el experimento 1 se emplearon 64 alpacas de raza Huacaya, propiedad de las comunidades de Palca, con un rango de edad entre 3 - 6 años, con cría al pie, sin problemas al parto y luego de haber cumplido 15 días de descanso post parto. En el experimento 2 se utilizaron 10 alpacas sin cría al pie. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones de pastoreo con pasturas naturales y separados de los machos.

3.3. Obtención del plasma seminal

El plasma seminal se obtuvo un mes antes del experimento mediante colección de semen de 5 machos con el uso de vagina artificial adaptada en un maniquí de alpaca. El eyaculado fue

diluido 1:1 (v/v) con fosfato salino bufferado (PBS) y centrifugado a 700 g por 30 minutos, para separar la fracción celular del plasma seminal. Luego fue decantado en tubos falcon de 10 ml, se agregó penicilina – estreptomicina (Penicilin – Streptomycin , GIBCO) al 10 % y fue llevado a congelación a –20 °C hasta su uso.

3.4. Diseño Experimental

EXPERIMENTO 1:

3.4.1 Inseminación Artificial de alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal o análogo de GnRH.

a. Evaluación ecográfica pre-experimental

La selección de las 64 alpacas hembras se basó en la presencia de folículos ováricos ≥ 7 mm de diámetro. Estos animales fueron evaluados con un ecógrafo ALOKA y un transductor lineal.

b. Aplicación de los tratamientos

El día de la aplicación de los tratamientos considerado como día 0 (D_0), los animales designados se distribuyeron en 2 grupos; al primero se le administró 2 ml de la solución de plasma seminal y al segundo grupo también 1 ml (0.0042 mg) de un análogo de GnRH (Acetato de buserelina) (Conceptal, Intervet International GmbH, Alemania), ambos vía inyección intramuscular.

Cuadro 2. Distribución de Grupos experimentales

Grupo	Tratamiento	Número de animales
G₁	Plasma seminal	32
G₂	GnRH	32

c. Inseminación artificial

Para la colección de semen se utilizaron 3 machos previamente entrenados en el uso de la vagina artificial, la cual se cubrió con una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura de 38° C, todo esto incorporado dentro de un maniquí de alpaca.

Una vez terminada la colección, se determinó el volumen del semen mediante lectura directa de un tubo Falcon graduado de 15 ml. El color del semen fue evaluado como blanco lechoso o blanco cremoso.

Para evaluar la motilidad espermática se colocó una gota de la muestra en una lámina portaobjetos temperada (37° C) y se procedió a la evaluación subjetiva de la motilidad mediante la observación de 10 campos en un microscopio OLYMPUS a 40x, utilizándose solo los que presentaron una motilidad igual o mayor a 65 %.

La concentración espermática se determinó utilizando una dilución de 1:100 tomando 10 ul de la muestra a la cual se le agregó 990 ul de agua. Posteriormente se cargó la cámara de Neuvauer con la dilución antes mencionada y se contaron los espermatozoides dentro de los campos definidos en la cámara (5 cuadrantes), mediante el uso de un microscopio a 40x de aumento. A la cantidad de espermatozoides observados se le multiplicó por el factor correspondiente (1000000). La concentración espermática fue expresada en millones/ml.

Posteriormente, el semen fue diluido con una solución de 0.6 % de Suero de Albúmina Bovina, 0.3 % de glucosa y 0.1% de antibiótico en 10 ml para una dilución de 1:1. Para eliminar efecto macho, siempre se utilizó el semen colectado de un determinado macho en animales de ambos tratamientos.

El semen fresco diluido a una dosis de 1 ml fue depositado dentro del cuerno uterino en el mismo lado que contenía el folículo pre-ovulatorio.

d. Evaluación ecográfica para determinar ovulación

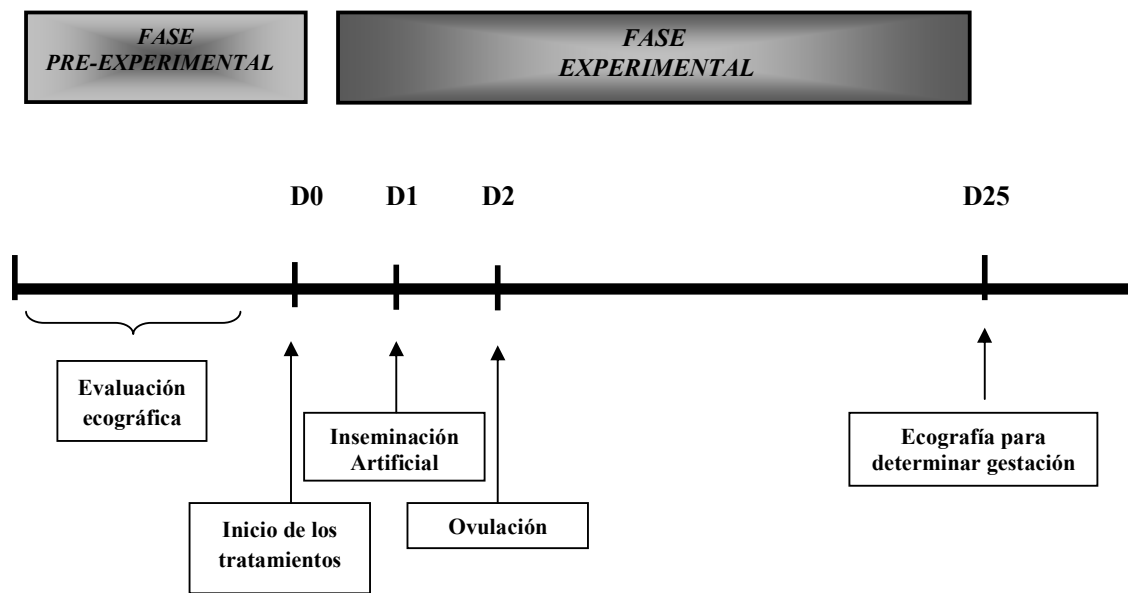
Se realizaron evaluaciones ecográficas de los ovarios 2 días después de iniciado el tratamiento (D₂) con la finalidad de determinar la tasa de ovulación basada en la desaparición del folículo dominante.

e. Diagnóstico de gestación

Se realizaron evaluaciones ecográficas a los 25 días para determinar la gestación en base a la presencia de estructuras uterinas compatibles con presencia de un embrión.

Fig 1.- Diseño Experimental

EXPERIMENTO 1



- Día -1,-2,-3** : Evaluación ecográfica y selección
- Día 0** : Aplicación de tratamientos
- Día 1** : Inseminación Artificial
- Día 2** : Evaluación ecográfica para determinar ovulación.
- Día 9** : Evaluación ecográfica.
- Día 25** : Ecografía para determinar vesícula embrionaria.

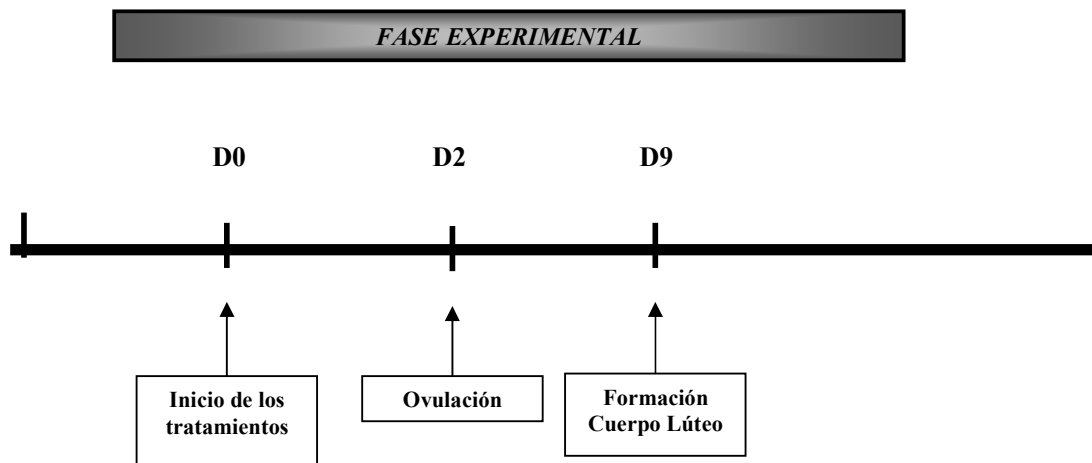
EXPERIMENTO 2

3.4.2 Inducción de ovulación y tamaño del Cuerpo Lúteo

Adicionalmente se realizó un experimento en alpacas hembras, las cuales fueron evaluadas mediante ecografía transrectal para determinar la presencia de folículos ováricos ≥ 7 mm y luego fueron designadas al azar para cada tratamiento. Posteriormente se les aplicó vía intramuscular 2 ml de plasma seminal (n=5) y 1 ml de un análogo de GnRH (Acetato de busarelina) (n=5). A los 8 días después del tratamiento se realizaron evaluaciones ecográficas con la finalidad de determinar el diámetro del cuerpo lúteo.

Fig 2.- Diseño Experimental

EXPERIMENTO 2



- Día 0** : Evaluación ecográfica y aplicación de tratamientos
Día 2 : Evaluación ecográfica para determinar ovulación.
Día 9 : Evaluación ecográfica.

3.5. Análisis Estadístico

Se utilizó el programa STATA 8 para el análisis de los resultados. La tasa de concepción fue analizado mediante la prueba de Diferencia de proporciones. El tamaño del cuerpo lúteo al octavo día post tratamiento, se analizó con la prueba de T- de Student.

IV. RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

4.1.- Tasa de Concepción

El cuadro 3 presenta los resultados del presente estudio, observándose que la tasa de concepción fue mayor en las hembras tratadas con plasma seminal (G₁): 75% frente a las hembras tratadas con GnRH (G₂): 53.1%.

Cuadro 3: Tasa de concepción en alpacas posterior a la aplicación IM de plasma seminal y GnRH.

Grupo	Tratamiento	Nº de hembras inseminadas	Nº de hembras preñadas	TASA DE CONCEPCIÓN (%)
G ₁	Plasma seminal	32	24	75.0 ^a
G ₂	GnRH	32	17	53.1 ^b

^{a,b} Letras diferentes en una misma columna presentan diferencia estadística significativa (p< 0.05)

4.2.- Tamaño del folículo dominante y tasa de ovulación

El cuadro 4 presenta el diámetro de los folículos presentes al inicio del experimento. Los dos grupos presentaron folículos ≥ 7 mm de diámetro, distribuidos en 7.5 ± 0.76 mm y 7.4 ± 0.66 mm, para los animales inducidos con plasma seminal y análogo de GnRH, respectivamente; siendo un tamaño folicular adecuado para la ovulación en ambos grupos.

Igualmente en el cuadro 4 se presenta la tasa de ovulación obtenida en los animales de ambos grupos, habiéndose obtenido un 100 % de ovulación en el grupo del plasma seminal y 90.6 % en el grupo de animales tratados con GnRH.

Cuadro 4: Tamaño del folículo dominante y tasa de Ovulación el día D₂ en alpacas con aplicación intramuscular de Plasma seminal y GnRH.

Tratamiento (n)	Diámetro Folículo (mm) Prom. \pm D.E.	TASA DE OVULACIÓN (%)
Plasma seminal (n = 32)	7.5 ± 0.76	100%* (32/32)
GnRH (n = 32)	7.4 ± 0.66	90.6%* (29/32)

* Diferencia entre grupos no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$)

4.3.- Características del semen de alpacas

El cuadro 5 presenta las principales características del semen obtenido de 3 alpacas machos mediante colección con vagina artificial y utilizado en la inseminación artificial de las alpacas.

Cuadro 5: Características del semen obtenido de Vagina artificial y maniquí de alpaca (n = 3)

Parámetros	Promedio ± DE X	Rango Mínimo - Máximo
Cópula (minutos)	19.85 ± 6.8	10 – 37
Volumen (ml)	1.55 ± 1.31	0.3 – 6
Concentración Espermática (x 10⁶)	132.4 ± 46.8	16 – 210
Motilidad Espermática (%)	65.2 ± 12.5	60 – 90

El tiempo de la monta osciló entre 10 y 37 minutos, el semen presentó un color variable entre cristalino a blanco lechoso, el aspecto fue viscoso, similar a un gel, en todos los eyaculados. El eyaculado promedio tuvo un volumen de 1.55 ± 1.31 ml y la concentración espermática promedio, obtenida en el presente estudio fue de 132.4 ± 46.8 millones de espermatozoides/ml. La motilidad espermática fue muy variable, fluctuando entre 60 - 90 %, con un promedio de 65.2 ± 12.5 %.

4.4.- Intervalo Administración de GnRH o Plasma seminal a la Inseminación Artificial

Respecto al tiempo transcurrido desde la inducción de ovulación hasta el momento de la inseminación, el cuadro 6 presenta los intervalos promedios para ambos tratamientos que no son diferentes.

Cuadro 6: Intervalo de horas entre la inducción de ovulación y la Inseminación artificial.

Tratamiento	Intervalo Inducción – IA (Horas)
Plasma seminal	$27:51 \pm 01:28$
GnRH	$27:54 \pm 01:14$

EXPERIMENTO 2

4.5.- Efecto de aplicación de plasma seminal o GnRH sobre diámetro del Cuerpo Lúteo

Los resultados del experimento 2 se presentan en el cuadro 7, donde se aprecia el promedio y desviación estándar del diámetro del folículo dominante y del cuerpo lúteo. Respecto al cuerpo lúteo, este alcanzó un diámetro de 15.2 ± 1.1 mm (Tratamiento plasma seminal) y 12.6 ± 2.1 mm (Tratamiento GnRH), habiéndose registrado diferencias estadísticas.

Cuadro 7: Diámetro del cuerpo lúteo (mm) el día D₈ post tratamiento

Tratamiento	Diámetro Folículo (mm) D ₀	Diámetro Cuerpo Lúteo (mm) D ₈
	Promedio \pm D.E.	Promedio \pm D.E.
Plasma seminal	8.0 ± 1.0	15.2 ± 1.1^a
GnRH	8.2 ± 0.5	12.6 ± 2.1^b

^{a,b} Letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

V. DISCUSIÓN

Investigaciones previas han demostrado la presencia de un componente proteico presente en el plasma seminal de alpacas y llamas, denominado Factor Inductor de Ovulación (FIO), con capacidad de inducir ovulación, habiendo sido reportado por Adams *et al.* (2005) y López *et al.* (2006), señalándose que la administración del plasma seminal vía intramuscular permite obtener un 100 % de ovulación en alpacas y llamas. El primer reporte sobre la presencia de un factor inductor presente en el plasma seminal de alpacas fue realizado por Ríos M. (1985), aún cuando en camellos se había reportado previamente la presencia de un factor presente en el plasma seminal, causante de inducir la ovulación (Chen *et al.* 1985).

Aún cuando los estudios reportaban el efecto del plasma seminal de inducir ovulación, no se conocía su efecto al ser utilizado bajo condiciones de campo para la aplicación de la técnica de inseminación artificial y su relación con la tasa de concepción. Los resultados del presente estudio señalan que la administración del plasma seminal para inducir ovulación en un protocolo de Inseminación Artificial, permitió obtener una tasa de ovulación del 100 % respecto al 90.6 % de las alpacas inducidas a ovulación con un análogo de Hormona liberadora de la Gonadotropina (Acetato de buserelina), confirmando los reportes previos de Adams *et al.* (2005) y López *et al.* (2006).

Respecto a la tasa de concepción, los resultados obtenidos señalan que los animales inducidos a ovulación con plasma seminal obtienen una mejor tasa de concepción, con un 75,0 % respecto al 53,1 % de las alpacas inducidas con el análogo de GnRH.

Adams *et al.* (2005) señalan que el plasma seminal tiene una potente actividad biológica, no solo por su capacidad de inducir ovulación sino por su acción sobre la secreción de la Hormona Luteinizante (LH), reportando que la secreción de las concentraciones de LH plasmático fue significativamente mayor en los animales inducidos a ovulación con plasma seminal respecto a los animales inducidos con un análogo de GnRH, por lo que su acción biológica esta relacionada también con una actividad luteotrópica, contribuyendo a la formación de un cuerpo lúteo de mayor tamaño y con una mayor capacidad de secreción de progesterona, duplicando la secreción de progesterona producida por el cuerpo lúteo formado por la inducción de ovulación con el análogo de la GnRH. Un efecto similar es reportado en la camella al administrarle vía intramuscular el plasma seminal del camello macho (Bhasin y Swerdlof, 1984; Li et al.1987; citados por Vásquez *et al.*(2008)

En el presente estudio, si bien no se ha determinado los perfiles de progesterona ni de LH, el estudio fue complementado con un experimento para determinar posibles diferencias en el tamaño del cuerpo lúteo, coincidiendo con lo reportado por Adams *et al.* (2005), al registrarse un cuerpo lúteo de 15.2 ± 1.1 mm en los animales inducidos a ovulación con plasma seminal, respecto a los 12.6 ± 2.1 mm de cuerpo lúteo, en los animales inducidos con el análogo de GnRH al día 8, según se reporta en el cuadro 5. Estas diferencias entre el tamaño del cuerpo lúteo entre ambos grupos podrían explicar las diferencias en la tasa de concepción, debido a que una posible mayor secreción de progesterona por estructuras de mayor tamaño deberían secretar mayores niveles de progesterona y por ende contribuir a mejorar el ambiente uterino para el embrión y contribuyendo a una mejor tasa de sobrevivencia embrionaria.

Acorde al reporte de Adams *et al.* (2005), el aumento de las concentraciones de LH fue mas tarde en el grupo del plasma seminal comparado con el grupo de GnRH, lo que puede sugerir que el FIO del plasma seminal y que la GnRH tienen efecto sobre la secreción hipofisiaria de LH pero que son moléculas diferentes. Esta hipótesis ha sido reportada por Ratto *et al.* (2010), señalándose que la fracción de peso molecular, responsable de inducir ovulación, tiene un tamaño $>$ a los 30kDa, peso que es significativamente menor al de GnRH (1.182 kDa). Panez *et al.* (2009) demostraron que el FIO presente en el plasma seminal de la alpaca posee una acción vía sistémica después de una administración intramuscular, y los diferentes grados de absorción del FIO con la administración intrauterina sin curetaje y con curetaje sugieren que el sitio probable de absorción se realiza a nivel de la mucosa uterina.

La actividad biológica del Factor de inducción no se conoce, aunque se propone que podría actuar directamente a nivel del ovario como lo hace la LH o a nivel de tejido encefálico a nivel

de neuronas noradrenérgicas del cerebro medio, similar como sucede normalmente en animales de ovulación inducida después del estímulo de la cópula (Bakker y Baum, 2000). Posterior a la estimulación de las neuronas que sintetizan GnRH esta sería liberada al hipotálamo mediobasal, y desde aquí conducida a la hipófisis para inducir la secreción de LH y posteriormente ovulación.

Adams *et al.*(2005) reportó que el primer incremento significativo de LH en el grupo de plasma seminal se detectó 1 hora después del tratamiento. A las 2 horas después del tratamiento, las concentraciones plasmáticas de LH fueron similarmente elevadas en los grupos de GnRH y plasma seminal. Dentro de los individuos, la concentración plasmática de LH se encontró a las 1.4 ± 0.2 y 1.9 ± 0.2 horas después de los tratamientos de GnRH y plasma seminal respectivamente. Las concentraciones de plasma permanecieron elevadas por un periodo mas largo en el grupo del plasma seminal que en el grupo de GnRH y no disminuyeron a niveles iniciales hasta 8 horas después de iniciado el tratamiento. En el grupo de GnRH, LH plasmático empezó a disminuir a las 5 horas después del tratamiento y fue similar a los niveles iniciales 5.5 horas después del inicio del tratamiento. Esto evidencia que el FIO y el GnRH afecta de manera diferente a la hipófisis y a la liberación de LH.

El cuerpo lúteo tiende a crecer por un periodo mas prolongado y un mayor diámetro en el grupo de plasma seminal comparado con el grupo de GnRH. Las concentraciones plasmáticas de progesterona fueron más altas en el grupo del plasma seminal que en el grupo de GnRH. En ambos grupos, de plasma seminal y GnRH, las concentraciones de progesterona aumentaron marcadamente a los valores máximos el día 7 y disminuyeron bruscamente a un valor bajo el día 11.

Por consiguiente, el grado de de luteogénesis es directamente proporcional a la duración de liberación preovulatoria de LH. Una prolongada liberación de LH durante la fase preovulatoria es necesaria para alcanzar luteinización normal de células de la granulosa, expresión de receptores de progesterona y desarrollo de un cuerpo lúteo funcional (Adams *et al.* 2005).

VI. CONCLUSIONES

- La tasa de concepción en alpacas hembras inducidas con Plasma seminal fue del 75.0 %, superior al 53.1 % obtenido en los animales inducidos con un análogo de GnRH.
- El tamaño del cuerpo lúteo de los animales inducidos a ovulación con plasma seminal fue del 15.2 ± 1.1 mm superior al 12.6 ± 2.1 mm del tamaño del cuerpo lúteo de las alpacas inducidas a ovulación con un análogo de GnRH.

VII. LITERATURA CITADA

1. Aba, M.; Forsberg, M.; Kindahl, H.; Sumar, J; Edqvist, L. 1995. Endocrine changes after mating in pregnant and non – pregnant llamas and alpacas. Act. Vet. Scand. 36: 489 – 498.
2. Aba, M.; Bravo, P.; Forberg, M.; Kindahl, H. 1997. Endocrine changes during early pregnancy in the alpaca. Anim Reprod Sci. 47: 273 – 279.
3. Aba, M.; Sumar, J.; Kindahl, H.; Forsberg, M.; Edqvist, L. 1998. Plasma concentrations of 15-ketodihydro - PGF(2-alpha), progesterone, estrone sulphate, estradiol-17-beta and cortisol during late-gestation, parturition and the early postpartum period in llamas and alpacas. Anim Reprod Sci. 50: 111 – 121.
4. Aba, M.; Kindahl, H.; Forsberg, M.; Quiroga, M.; Auza, N. 2000. Level of progesterone and changes in prostaglandina F_{2α} release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. Anim Reprod Sci. 59: 87 – 97.
5. Adams, G.; Griffin, P; Ginther, O. 1989. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. Biol Reprod. 41(3): 551 – 558.
6. Adams, G.; Sumar, J; Guinther, O 1990. Effect of lactation and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*) J. Reprod Fert. 90: 535.

7. Adams, G.; Sumar, J.; Ginther, O. 1991. Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim Reprod Sci.* 24: 127 – 138.
8. Adams, G.; Sumar, J.; Ginther, O. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J Reprod Fertil.* 96: 627 – 664.
9. Adams, G.; Ratto, M. 2001. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Rev Inv Vet Perú* 1: 134–141.
10. 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.
11. Aller, J. 1997. “Synchronisation of follicular wave in llama (*Lama glama*) in two seasons (winter and summer)”. *Revista Argentina de Producción Animal* 17(1): 243.
12. Aller, J. 1997. Ciclo folicular natural vs. ciclo sincronizado en llamas (*Lama glama*). *Revista argentina de Producción Animal.* 17 (1): 246.
13. Aller, J.; Ferre L; Rebuffi, G.; Alberio R. 1997. Inseminación artificial en llamas. *Rev. Vet. Arg.* 16: 367 – 374.
14. Aller, J.; Canicno A.; Rebuffi G.; Alberio, R. 1999. Inducción de la ovulación en llamas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco. Libro de resúmenes. p 91.
15. Aller, J.; Rebuffi, G.; Cancino, A.; Alberio, R. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* 52: 15-23.
16. Arthur, G. 1991. Reproducción y obstetricia veterinaria. 1ª edición. Editorial Interamericana. p 6 – 8.
17. Ax, R.; Dally M.; Didion B.; Lenz R.; Love, C.; Varner, D.; Hafez, B.; Bellin, M. 2002. Evaluación del semen. En: Hafez, E.S.E. y Hafez, B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México. McGraw-Hill. p 519.

18. Bakker, Y.; Baum, M. 2000. Neuroendocrine regulation of GnRH₁ release in induced ovulators. *Neuroendocrinology*. 21: 220 – 262.
19. Bearden, J.; Fuquay, J. 1982. *Reproducción animal aplicada*. 1° Ed. México: Manual Moderno. 185 p.
20. Bourke, D.; Adam, C.; Kyle, C. 1992. Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Vet. Rec.* 130: 424 – 428.
21. Bravo, W.; Sumar, J. 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim Reprod Sci.* 21: 271 – 281.
22. Bravo, W.; Fowler, M.; Stabenfeldt, G.; Lasley, B. 1990a. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biol Reprod.* 43: 579 – 585.
23. Bravo, W.; Fowler, M.; Stabenfeldt, G. 1990b. Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology*. 33: 891 – 899.
24. Bravo, 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.
25. Bravo, W.; Varela, M. 1993. Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). *Anim Reprod Sci.* 32: 245 – 252.
26. Bravo, W.; Johnson, L. 1994. Reproductive physiology of the male camelid. En: *Llama medicine. Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*. 10: 259 – 264.
27. Bravo, W.; Tsutsuib, T.; Lasley, L. 1995. Dose response to equine chorionic gonadotropin and subsequent ovulation in llamas. *Small Ruminant Research*. 18: 157-163.
28. Bravo, W.; Moscoso, J.; Ordoñez, C.; Alarcon, V. 1996. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Anim Reprod Sci.* 43: 2 – 3.
29. Bravo, W.; Flores, U.; Ordóñez, C. 1997a. Effect of repeated Collection on semen characteristics of alpacas. *Biol Reprod.* 57: 520 – 524.

30. Bravo, W.; Flores, U.; Garnica, J.; Ordóñez, C. 1997b. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*. 47: 619 – 626.
31. Bravo, W.; Solis P.; Ordoñez C.; Alarcón V. 1997c. Fertility of the male alpaca. Effect of daily consecutive breeding. *Anim Reprod Science*. 46: 305 – 312.
32. Bravo, W. 1998. Avances en la Fisiología Reproductiva del macho llama y alpaca. En: XXI Reunión Científica Anual de la APPA. Puno: Asociación Peruana de Producción Animal.
33. Bravo, W.; Pacheco, C.; Quispe, G.; Vilcapza, L.; Ordoñez, C. 1999. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Archives of Andrology*. 43: 239-246.
34. Bravo, W.; Moscoso, R.; Alarcón, V.; Ordoñez, C. 2002. Ejaculatory process and related semen characteristics. *Archives of Andrology*. 48: 65-72.
35. Bravo, W.; Ccallo, M.; Gárnica, J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research*. 38: 91:95.
36. Bravo, W.; Skidmore, J.; Zhao, X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction science 2000a*. 62: 173-193.
37. Bravo, W. 2002. *The Reproductive Process of South American Camelids*. Ed. Framagann Graphics, Patti eddington. UT. USA. 100 p.
38. Brown, B. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sic*. 58: 169 – 195.
39. Bustinza, V. 2001. La alpaca: Conocimientos del gran potencial andino. Ed. Instituto de investigación y promoción de Camélidos Sudamericanos. Puno. p 148 – 184.
40. Calderón, W.; Sumar, J.; Franco, E. 1968. Avances en la inseminación artificial de las alpacas (*Lama pacos*). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú*. 22: 19 – 35.

41. Chaves, M.; Aba, M.; 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. *Reproduction science*. 69: 37 – 46.
42. Chen, B.; Yuen, Z.; Pan, G. 1985 Semen-induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*) *J Reprod Fert*. 73: 335 – 338.
43. Chuna, P.; Leyva, V.; Franco, V. 1999. Adherencias pene – prepuciales y niveles de testosterona circulantes en alpacas. *Rev Inv Vet Perú*. 10(2): 11 – 16.
44. Dávalos, R. y Olazábal, J. 2002. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Rev Inv Vet Perú*. 13 (2): 98 – 99.
45. De la Vega, D. 1996. Efecto de la concentración espermática y la hora de inseminación artificial con semen fresco sobre el porcentaje de gestación en alpacas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 54 p.
46. Del Campo, M.; Del Campo, C.; Mapletoft, R. 1995. The application of new reproductive Technologies to South American Camelids. *Theriogenology*. 43: 21 – 30.
47. Delhon y Von Lawzewitsch, 1987; Reproduction in the male llama (*Lama glama*), a South American Camelid. I Spermatogenesis and Organization of the intertubular space of the mature testis. *Acta Anatomica*. 129: 59 – 66.
48. ElWishy, A. 1998. Reproduction in the male dromedary (*Camelus dromedaries*): A review. *Anim Reprod Sci*. 17: 217 – 241.
49. England B.; Foote, W.; Mattheus, D.; Cardozo, A; Riera, S. 1971. Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). *Anim Behavior*. 19: 722 – 726.
50. England, B.; Foote, W.; Matthews, D.; Riers, S. 1969. Ovulation and corpus luteum function in the llama (*Lama glama*). *J. Endocr*. 45: 505 – 513.
51. Escobar, R. Mating, parturition. 1984. *The Llama, animal Breeding and Production of South American Camelids*. Ed Hennig R. 358 p.

52. Fernández Baca, S. y Calderón, M. 1966. Métodos de colección de semen de la alpaca. Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM. Vol. 18-20: 13-26.
53. Fernández Baca, S. y Novoa C. 1968. Conducta sexual de la alpaca (*Lama pacos*) en empadre en campo. En: Resúmenes de las investigaciones del IVITA en CSA. Publicación IVITA N° 25.
54. Fernández Baca, S.; Hansel, W.; Novoa, C. 1970. Embryonic mortality in the alpaca. Biol. Reprod. 3: 243 – 251.
55. Fernández Baca, S.; Madden, D.; Novoa, C. 1970. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. J Reprod Fertil. 22: 261 – 267.
56. Fernández Baca, S.; Sumar, J.; Novoa C. 1972. Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. Rev Inv Vet Perú. 1(2): 115 – 228.
57. Fernández Baca, S.; 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. Animal Reproduction Science. 33: 307 – 323.
58. Fowler, M.; Bravo, W. 1998. Reproduction. En: Fowler, M.E. (Ed), Medicine and surgery of South American Camelids, Second Ed. Iowa State University Pres. USA. p 381 – 429.
59. Franco, E.; Sumar, J.; Varela, M. 1981. Eyaculación en la alpaca (*Lama pacos*). En: IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Chile: Corporación Nacional Forestal. Instituto de la Patagonia.
60. Galindo, W. Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno. Univ. Nac. del Altiplano. p 25.
61. Galloway, D. 2000. The development of the testicles in alpacas in Australia. En: Proceedings of the Australia Alpaca Industry Conference. Canberra.
62. Garner, D.; Hafez, E. 2002. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: McGraw Hill. p 33 – 53.

63. Garnica, J.; Achata R.; Bravo,W. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci.* 32: 85 – 90.
64. Garnica, J.; Flores, E.; Bravo, W. 1995. Citric acid and fructose concentrations in seminal plasma of the alpaca. *Small Ruminant Research.* 18: 95-98.
65. Gauly, M. 1997. Seasonal changes in semen characters and serum concentrations of testosterone, oestradiol-17beta, thyroxine and triiodothyronine in male llamas (*Lama glama*) in Central Europe.. Justus-Liebig-Universitat, Fachbereich Veterinarmedizin, Giessen, Germany. 163 p.
66. Hafez, B. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7º ed. México. Mc Graw – Hill. 519 p.
67. 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.* 1: 462 – 463.
68. Illera, M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. Barcelona: Editorial AEDOS.. 390 p.
69. Johnson, L. 1989. Llama reproduction. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim.* 5: 159 – 182.
70. Khatir, H.; Anouassi, A. 2004. Production of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos by IVM and IVF and coculture with oviductal or granulosa cells. *Theriogenology.* 62: 1175 – 1185.
71. Khatir, H.; Anouassi, A. 2005. In Vitro and in vivo development competent of Dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos produced in vitro using two culture systems (Mkso-Maa and oviductal cell). *Reprod. Domestic. Anim.* 40: 245 – 249.
72. Knight, T.; Death, A.; Wyeth, T.; Hill, F. 1992. Effects of GnRH and of single versus multiple mating on the conception rate in alpacas. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 52: 311 – 312.
73. Leon, 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: 503 – 511.

74. Leyva, V.; Sumar, J. 1984. Estudio preliminar de la concentración de espermatozoides de semen de alpaca obtenida con vagina artificial. En: III Reunión Asoc. Per. Prod. Anim. Lima, Perú.
75. Leyva, V.; Sumar, J. 1981. Evaluación del peso corporal al empadre sobre la capacidad reproductiva de hembras alpaca de un año de edad. En: IV Conv. Internacional Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas, Chile.
76. Leyva, V. y García, W. 1999. Efecto de la Progesterona exógena sobre la función del Cuerpo Lúteo de Alpacas. En: II Congreso mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.
77. Lichtenwalner, A.; Woods, G.; Weber, J. 1996a. Ejaculatory pattern of llamas during copulation. *Theriogenology*. 46: 285 – 291.
78. Lichtenwalner, A.; Woods, G.; Weber, J. 1996b. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology*. 46: 293 – 305.
79. López, A.; Huanca, W.; Leyva V. 2006. Inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal de llama, alpaca y toro. *Rev Inv Vet*. 17 (2): 114-18
80. Losno, W.; Coyutupa J. 1981. Niveles de testosterona sérica post coito en alpacas adultas. *Resum Proyect Invest realizadas por la UNMSM*. 1975 – 1979. N° 2: 114. Lima.
81. McEvoy, T.; Bourke, D.; Adam, C. 1994. Recent advances in understanding and controlling the reproductive biology of South American camelids. En: *Proc Assisted Reproductive Technology and Andrology Meeting*. 5: 277 – 298.
82. McEvoy, T.; Kyle C.; Slater, D.; Adam, C.; Bourke, D. 1992. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *Journal of Reproduction and Fertility*. 9: 81.
83. Mckimon, A.; Tinson, A. 1992. Embryo transfer in dromedary camels. *Theriogenology*. 41: 145 – 150.

84. Miragaya, M.; Aba M.; Capdevielle, E.; Ferrer, M.; Chavez M.; Rutter B.; Agüero A. 2004. Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*. 61(4): 663 – 671.
85. Mogrovejo, D. 1952. Estudio del semen de la alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 27 p.
86. Montalvo, C.; Cevallos, E.; Copaira, M. 1979. Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. Resúmenes Proyectos de Investigación, 1975 – 1979. UNMSM. Lima p 37.
87. Mosquito, R.; Ordoñez, C.; Alarcon, V.; Bravo, W. 1999. Contracciones pene – uretrales durante la cópula y características seminales de llamas y alpacas. Proc II Congreso Mundial sobre camélidos, CUSCO, PERU. p 77.
88. Neely, D. 1993. Reproductive aspects of the male llama. Proceedings of the Hudson-Walker Theriogenology Conference. 4: 31-39.
89. Novoa, C.; Fernández Baça S.; Sumar J.; Leyva, V. 1972. Pubertad en la Alpaca. *Rev Inv Vet*. 1: 29 – 35.
90. Novoa, C. 1970. Reproduction in the camelidae. *J. Reprod. Fert*. 22: 3 – 20.
91. Novoa, C.; Leyva, V. 1996. Reproduction en alpacas y llamas. Publicación científica. *IVITA* 26 (30): 3 – 18.
92. Olivera, L.; Zago, D.; Jones, C.; Bevilacqua, E. 2003. Developmental changes at the materno – embryonic interface in early pregnancy of the alpaca (*Lamos pacos*). *Anat Embryol*. 207: 317 – 331.
93. Paolicchi, F.; Urquieta, B.; DelValle, L.; Bustos, O. 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas, stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Anim Reprod Sci*. 54: 203 – 210.
94. Pan, G.; Zhao, X.; Chen, B.; Jiang, S.; Huang, Y.; Zu, Y.; Wang, H. 1992. The ovulation-inducing effect of seminal plasma in the Bactrian camel. En: Proceedings of the First International Camel Conference. Dubai.

95. Pan, G.; Chen, Z.; Liu X.; Li, D.; Xie, Q.; Ling, F.; Fang, L. 2001. Isolation and purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology*. 55: 1863 – 1879.
96. Pánez, S.; Huanca, W.; Huanca, T.; Ratto, M.; Adams, G. 2009. Efecto del sitio de deposición del plasma seminal sobre la tasa de ovulación y formación del cuerpo lúteo en alpacas. *Rev Inv Vet Perú*. 20 (1): 21-27.
97. Parraguez, V.; Cortez, S.; Gazitua, F.; Ferrando, 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.
98. Pollard, J.; Littlejohn, R.; Moore, G. 1995. Seasonal and other factors affecting the sexual behavior of alpacas *Anim Reprod Science*. 37: 349 – 356.
99. Quintano, J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nacional del Altiplano. 48 p.
100. Quispe, F. 1987. Evaluación de las características físicas del semen de alpaca durante la época de empadre. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nacional del Altiplano. 70 p.
101. 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.
102. Ratto, M.; Singh, J.; Huanca, W.; Adams, G. 2006. Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim Reproduc Sci*. (3-4): 299 – 306.
103. Ratto, M.; Huanca, W.; Adams, G. 2010. Ovulation inducing factor: A protein component of llama seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinology*. 8: 44.

104. Raymundo, F.; Huanca, W.; Huanca, T.; Huerta, S.; Cordero, A. 2006. Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *Rev Inv Vet Perú*. 17: 125-130.
105. Ridland, M.; Knight, T.; Wyeth, T. 1992. Measurement of foetal size by ultrasonography and progesterone concentrations in pregnant alpacas. *Anim. Prod.* 53: 437 – 438.
106. Ríos, M. 1985. Presencia de un factor de inducción de la ovulación en el semen de alpaca y toro. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 30p.
107. San Martín, M; Copaira, M.; Zúñiga, J.; Rodríguez, R.; Bustinza, G.; Acosta, L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fert.* 16: 395 – 399.
108. 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
109. Shille, V.; Munro, C.; Walker-Farmer, S.; Papkoff, H.; Stabenfeldt, G. 1983. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *J Reprod Fert.* 68: 29 – 39.
110. Skidmore, Y.; Billah, M.; Allen, W. 1996. The ovarian follicular wave pattern in the mated and non- mated dromedary camel (*Camelus dromedaries*). *J Reprod Fert.* 49: 545 – 548.
111. Smith, C.; Peter, A.; Pugh, D. 1994. Reproduction in llamas and alpacas: A review. *Theriogenology*. 41: 201 – 209.
112. Smith, B. 1999 Overview of reproduction in the male llama and alpaca. *Proceedings of the Society for Theriogenology*. p 191 – 196.
113. Sorensen, A. 1991. Evaluación de la aptitud reproductiva. En: Sorensen A, Ed. *Reproducción animal, principios básicos y prácticas*. 1º ed. Mc Graw – Hill. p 124 – 143.
114. Spies, H. 1997. Neuroendocrine signals in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Chin J Physiol* 40(4):181-96.

115. Sumar, J.; Leyva, V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en alpacas (*Lama pacos*). En: Res. IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos Chile-Punta Arenas. p 7.
116. Sumar, J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. Masters Thesis. Suiza: Swedish University of Agriculture and Science. 90 p.
117. Sumar, J. 1985. Reproductive physiology in South American camelids. En: Genetics of Reproduction in Sheep. Edit by Land, R; Robinson, S. London: Butterwothts. p 81 – 95.
118. Sumar, J.; Garcia M. 1986. Fisiología de la reproducción de la alpaca. En: Nuclear and related techniques in Animal Production and Health. Viena. p 149 – 177.
119. Sumar, J. 1988a. Removal of the ovarios or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. Acta Vet. Scan. 83: 133 – 141.
120. Sumar, J.; García, M.; Alarcón, V.; Echevarría, L. 1988b. Mecanismo de ovulación en camélidos sudamericanos domésticos. En: 6ª Conv Int sobre Camélidos Sudamericanos. Oruro. Publ. IVITA N° 25. p 55.
121. Sumar, J.; Bravo, W. 1991. In situ observation in the ovaries of llamas and alpacas by use of a laparoscopic technique. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199: 1159 – 1163.
122. Sumar, J. 1993. Efectos de los estímulos de inducción en la ovulación de alpacas y llamas. Rev Inv Pec. IVITA. Unmsm. Lima. Perú. 6(1): 17 – 21.
123. Sumar, J. 1994. Effects of various ovulation induction stimuli in alpacas and llamas. J. Arid Environ. 26: 39 – 45.
124. Sumar, J. 1996. Reproduction in llamas and alpacas. Anim Rep Sci. 42: 405 – 415.
125. Sumar, J. 1999. Reproduction in female South American domestic camelids. J. Reprod. Fertil. Suppl. 54: 169 – 178.
126. Sumar, J. 2000. Llamas and alpacas. Reproduction in farm animals. Edit by Hafez; ESE 7th Edition .USA. p 218-228.

127. Tibary A.; Anouassi, A. 1997. Theriogenology in Camelidae. Actes Editions, Rabat, Morocco.
128. Tibary, A.; Memon, M. 1999. Reproduction in the male South American Camelidae. Journal of camel Practice and Research. 6: 235 – 248.
129. Tibary A., 2001 Fertilization, embryo and fetal development in camelids. En: Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology. Vancouver, Canada. p 387 – 396.
130. Tibary, A.; Pugh, D. 2003. Infertility in the male lamoid. En: Proceedings Society for Theriogenology and American College of Theriogenologists Annual Conference. Columbus. p 304–312.
131. Tibary, A. 2004. Male Infertility in Camelids. En: Proceedings of the North American Veterinary Conference. Orlando, USA. p 292–296.
132. Urquieta, B.; Cepeda, R.; Caceres, J.; Raggi, L.; Rojas, J. 1994. Seasonal variation in some reproductive parameters of male vicuna in the High Andes of northern Chile. J. Arid Environ. 26: 79–87.
133. Vásquez, M.; Huanca, W.; Huanca, T.; Ratto, M.; Adams, G. 2008. Efecto de fracciones del plasma seminal, según su peso molecular, sobre la inducción de la ovulación en llamas (*Lama glama*). Rev Inv Vet Perú 19: 20 – 25.
134. Vaughan, J.; Tibary, A. 2006. Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations. 61: 59-281
135. Vaughan, J. 2001. Control of ovarian follicular growth in the alpaca (*Lama pacos*). PhD Thesis. Australia: Central Queensland University.
136. Vaughan, J.; Galloway, D.; Hopkins, D. 2003. Artificial Insemination in Alpacas (*Lama pacos*). A report for the Industrial Research and Development Corporation. RIRDC. p 90.
137. Velásquez, F.; Malaga, J.; Bravo, W. 1999. Citología exfoliativa del útero de la alpaca. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.

138. Von Kubicek, J. 1974. Semen collection in alpaca with a urethral fistula. Zeitschrift Tierzuchtung und Zuchtungsbiologie. 90:335–51
139. Xu, Y.; Wang, H.; Zeng, G.; Jiang, G.; Gao, Y. 1985. Hormone concentrations before and after semen – induce ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J Reprod Fert. 74: 341 – 346.
140. Zhao, X.; Li X.; Chen, B. 2001. Isolation of ovulation – inducing factors in the seminal plasma of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) by DEAE – cellulosa chromatography. Reprod Domestic Anim 36 (3 – 4): 177 – 181.

VIII. APÉNDICE

TRATAMIENTO CON PLASMA SEMINAL

N°	N° Alpaca	Edad años	Estado	Fecha de parto	Ecografía (Fase Pre-experimental)				Inducción (D ₀)		
					Fecha	Ovario	mm	Útero	Fecha	Hora	Dosis (ml)
1	65	2	Vacía c/cría	09/01/09	28/01/09	Der.	7	Flácido	29/01/09	7:18 AM	2
2	3557	4	Vacía c/cría	01/01/09	28/01/09	Der.	7	Flácido	29/01/09	7:20 AM	2
3	6491	3	Vacía c/cría	01/01/09	05/02/09	Izq.	8	Lig. turgente	06/02/09	6:17 AM	2
4	2766	4	Vacía c/cría	16/01/09	05/02/09	Izq.	7	Turgente	07/02/09	5:58 AM	2
5	3499	4	Vacía c/cría	28/12/08	05/02/09	Izq.	7	Flácido	07/02/09	6:05 AM	2
6	5961	3	Vacía c/cría	03/01/09	19/02/09	Der.	7	Lig. turgente	20/02/09	8:09 AM	2
7	1710	2	Vacía c/cría	04/01/09	21/02/09	Izq.	8	Turgente	22/02/09	5:00 AM	2
8	943	4	Vacía c/cría	10/01/09	21/02/09	Izq.	8	Turgente	22/02/09	5:06 AM	2
9	3553	3	Vacía c/cría	08/01/09	21/02/09	Der.	7	Flácido	22/02/09	5:11 AM	2
10	894	4	Vacía c/cría		05/03/09	Der.	8	Turgente	07/03/09	7:59 AM	2
11	1397	4	Vacía c/cría	04/02/09	05/03/09	Izq.	7	Flácido	08/03/09	7:08 AM	2
12	5575	3	Vacía c/cría	31/12/08	05/03/09	Izq.	7	Flácido	08/03/09	7:10 AM	2
13	3580	2	Vacía c/cría	30/12/08	08/02/09	Der.	7	Turgente	10/03/09	7:20 AM	2
14	918	3	Vacía c/cría		05/03/09	Izq.	7	Flácido	10/03/09	7:23 AM	2
15	41339	3	Vacía c/cría	17/01/09	08/03/09	Izq.	8	Lig. flácido	10/03/09	7:28 AM	2
16	3558	4	Vacía c/cría	30/01/09	11/03/09	Der.	7	Flácido	12/03/09	9:14 AM	2
17	893	4	Vacía c/cría	22/02/09	14/03/09	Der.	7	Turgente	15/03/09	8:00 AM	2
18	929	4	Vacía c/cría	08/03/09	25/03/09	Der.	8	Turgente	27/03/09	9:50 AM	2
19	1301	4	Vacía c/cría	20/01/09	02/03/09	Izq.	8	Turgente	03/03/09	6:24 AM	2
20	1312	2	Vacía c/cría	14/02/09	05/03/09	Der.	7	Turgente	08/03/09	7:56 AM	2
21	1303	3	Vacía c/cría		11/03/09	Izq.	7	Flácido	12/03/09	9:06 AM	2
22	5396	3	Vacía c/cría	09/02/09	12/03/09	Der.	7	Lig. turgente	15/03/09	9:27 AM	2
23	5388	4	Vacía c/cría	21/02/09	12/03/09	Izq.	7	Lig. turgente	15/03/09	9:30 AM	2
24	5392	4	Vacía c/cría	09/02/09	15/03/09	Der.	7	Lig. turgente	16/03/09	9:10 AM	2
25	5393	3	Vacía c/cría	20/02/09	18/03/09	Der.	7	Lig. turgente	20/03/09	9:43 AM	2
26	5390	3	Vacía c/cría	20/02/09	20/03/09	Izq.	7	Lig. turgente	23/03/09	8:45 AM	2
27	2054	2	Vacía c/cría		29/01/09	Der.	8	Lig. turgente	30/01/09	6:39 AM	2
28	419	4	Vacía c/cría		29/01/09	Der.	7	Turgente	30/01/09	6:40 AM	2
29	404	4	Vacía c/cría		05/02/09	Der.	9	Lig. turgente	06/02/09	5:29 AM	2
30	101	4	Vacía c/cría		05/02/09	Der.	7	Lig. turgente	06/02/09	5:32 AM	2
31	1460	3	Vacía c/cría		16/03/09	Izq.	9	Turgente	17/03/09	8:30 AM	2
32	338	4	Vacía c/cría		16/03/09	Izq.	10	Turgente	17/03/09	8:36 AM	2

Nº	Inseminación Día 1			Horas Post Induc.	Dx. Ecográfico Día 2		Dx Ecográfico Día 25				Estado	
	Fecha	Hora	Macho		Fecha		Fecha	Ovario	CL mm	Fol. mm	Preñada	Vacía
1	30/01/09	11:12 AM	2	27:54	31/01/09	Ovuló	23/02/09	Izq.	8		X	
2	30/01/09	11:00 AM	2	27:40	31/01/09	Ovuló	23/02/09	Izq.	9		X	
3	07/02/09	9:33 AM	2	27:16	08/02/09	Ovuló	03/03/09	Izq.	8		X	
4	08/02/09	10:51 AM	2	28:53	09/02/09	Ovuló	04/03/09	Izq.	9		X	
5	08/02/09	10:55 AM	2	28:40	09/02/09	Ovuló	04/03/09	Izq.		8		X
6	21/02/09	11:27 AM	4	27:18	22/02/09	Ovuló	17/03/09	Der.	7		X	
7	23/02/09	12:25 PM	12	31:25	24/02/09	Ovuló	19/03/09	Der.	9		X	
8	23/02/09	12:14 PM	12	31:08	24/02/09	Ovuló	19/03/09	Izq.	9		X	
9	23/02/09	8:50 AM	2	27:39	24/02/09	Ovuló	19/03/09	Izq.	10		X	
10	08/03/09	11:10 AM	2	27:11	09/03/09	Ovuló	01/04/09	Izq.	9		X	
11	09/03/09	11:42 AM	12	28:34	10/03/09	Ovuló	02/04/09	Der.		7		X
12	09/03/09	11:38 AM	12	28:28	10/03/09	Ovuló	02/04/09	Der.	8		X	
13	11/03/09	12:45 PM	4	29:25	12/03/09	Ovuló	04/04/09	Izq.		7		X
14	11/03/09	12:58 PM	4	29:35	12/03/09	Ovuló	04/04/09	Izq.		7		X
15	11/03/09	12:45 PM	4	29:17	12/03/09	Ovuló	04/04/09	Izq.	7		X	
16	13/03/09	12:35 PM	2	27:21	14/03/09	Ovuló	06/04/09	Der.				X
17	16/03/09	10:39 AM	2	26:39	17/03/09	Ovuló	09/04/09	Izq.	9		X	
18	28/03/09	12:43 PM	2	26:53	29/03/09	Ovuló	21/04/09	Izq.		6		X
19	04/03/09	10:31 AM	12	28:07	05/03/09	Ovuló	28/03/09	Der.		7		X
20	09/03/09	11:26 AM	2	27:30	10/03/09	Ovuló	02/04/09	Der.	7		X	
21	13/03/09	11:54 AM	2	26:48	14/03/09	Ovuló	06/04/09	Izq.	9		X	
22	16/03/09	10:36 AM	2	25:09	17/03/09	Ovuló	09/04/09	Der.	8		X	
23	16/03/09	10:30 AM	2	25:00	17/03/09	Ovuló	09/04/09	Der.	9		X	
24	17/03/09	12:00 M	12	26:50	18/03/09	Ovuló	10/04/09	Der.	11		X	
25	21/03/09	12:26 PM	2	26:43	22/03/09	Ovuló	14/04/09	Izq.	7		X	
26	24/03/09	11:25 AM	2	26:40	25/03/09	Ovuló	18/04/09	Der.	7		X	
27	31/01/09	12:13 PM	4	29:34	01/02/09	Ovuló	24/02/09	Izq.	10		X	
28	31/01/09	12:20 PM	4	29:40	01/02/09	Ovuló	24/02/09	Der.			X	
29	07/02/09	9:04 AM	2	27:35	08/02/09	Ovuló	02/03/09	Izq.	8		X	
30	07/02/09	9:01 AM	2	27:29	08/02/09	Ovuló	02/03/09	Izq.		7		X
31	18/03/09	11:00 AM	4	26:30	19/03/09	Ovuló	11/04/09	Izq.	8		X	
32	18/03/09	11:05 AM	4	26:29	19/03/09	Ovuló	11/04/09	Der.	8		X	

TRATAMIENTO CON GnRH

N°	Inseminación Día 1			Horas Post Induc.	Dx. Ecográfico Día 2		Dx Ecográfico Día 25				Estado	
	Fecha	Hora	Macho		Fecha		Fecha	Ovario	CL mm	Fol. mm	Preñada	Vacia
1	30/01/09	11:05 AM	2	27:51	31/01/09	Ovuló	24/02/09	Izq.	9		X	
2	30/01/09	11:00 AM	2	27:44	31/01/09	Ovuló	24/02/09	Der.		6		X
3	07/02/09	9:37 AM	2	27:18	08/02/09	Ovuló	03/03/09	Der.		7		X
4	08/02/09	10:45 AM	2	28:43	09/02/09	Ovuló	04/03/09	Der.	7		X	
5	08/02/09	10:48 AM	2	28:40	09/02/09	Ovuló	04/03/09	Der.		8		X
6	21/02/09	11:20 AM	4	27:16	22/02/09	Ovuló	17/03/09	Izq.	7		X	
7	23/02/09	12:03 PM	12	31:08	24/02/09	Ovuló	19/03/09	Izq.	7		X	
8	23/02/09	8:54 AM	12	27:50	24/02/09	Ovuló	19/03/09	Izq.	9		X	
9	23/02/09	9:05 AM	2	28:08	24/02/09	Ovuló	19/03/09	Der.	9		X	
10	08/03/09	11:15 AM	2	27:09	09/03/09	Ovuló	01/04/09	Der.	9		X	
11	09/03/09	11:49 AM	12	28:44	10/03/09	Ovuló	02/04/09	Izq.	7		X	
12	09/03/09	11:46 AM	12	28:33	10/03/09	Ovuló	02/04/09	Der.		7		X
13	11/03/09	12:41 PM	4	29:29	12/03/09		04/04/09	Der.		7		X
14	11/03/09	12:28 PM	4	28:38	12/03/09	Ovuló	04/04/09	Izq.	9		X	
15	11/03/09	12:37 PM	4	29:22	12/03/09	Ovuló	05/04/09	Izq.		10		X
16	13/03/09	12:06 PM	2	26:51	14/03/09		05/04/09	Der.		7		X
17	16/03/09	10:47 AM	2	26:44	17/03/09	Ovuló	09/04/09	Izq.	8		X	
18	28/03/09	10:36 AM	2	27:23	29/03/09	Ovuló	21/04/09	Izq.	9		X	
19	04/03/09	10:44 AM	12	28:18	05/03/09	Ovuló	28/03/09	Der.	9		X	
20	09/03/09	11:31 AM	2	27:32	10/03/09	Ovuló	02/04/09	Izq.		8		X
21	13/03/09	11:50 AM	2	26:42	14/03/09	Ovuló	06/04/09	Der.		4		X
22	16/03/09	10:44 AM	2	25:24	17/03/09	Ovuló	09/04/09	Der.		7		X
23	16/03/09	10:51 AM	2	25:29	17/03/09	Ovuló	09/04/09	Izq.	9		X	
24	17/03/09	11:28 AM	12	28:16	18/03/09	Ovuló	10/04/09	Der.		7		X
25	21/03/09	12.20 a.m.	2	26:50	22/03/09	Ovuló	14/04/09	Izq.	9		X	
26	24/03/09	12:17 PM	2	28:05	25/03/09	Ovuló	17/04/09	Izq.	8		X	
27	31/01/09	12:16 AM	4	29:51	01/02/09	Ovuló	24/02/09	Der.		7		X
28	31/01/09	12:24 AM	4	29:57	01/02/09	Ovuló	24/02/09	Der.		7		X
29	07/02/09	8:58 AM	2	27:31	08/02/09	Ovuló	02/03/09	Izq.	9		X	
30	07/02/09	9:07 AM	2	27:42	08/02/09	Ovuló	02/03/09	Izq.	7		X	
31	18/03/09	10:44 AM	4	26:46	19/03/09		11/04/09	Der.		6		X
32	18/03/09	11:15 AM	4	27:10	19/03/09	Ovuló	11/04/09	Der.		7		X

N°	N° Alpaca	Edad años	Estado	Fecha de parto	Ecografía (Fase Pre-experimental)				Inducción (D ₀)		
					Fecha	Ovario	mm	Útero	Fecha	Hora	Dosis ml
1	3566	2	Vacía c/cría	28/12/08	28/01/09	Der.	7	Flácido	29/01/09	7:14 AM	1
2	3556	4	Vacía c/cría	13/01/09	28/01/09	Der.	7	Lig. turgente	29/01/09	7:16 AM	1
3	2856	4	Vacía c/cría	14/01/09	05/02/09	Der.	8	Turgente	06/02/09	6:19 AM	1
4	2777	3	Vacía c/cría	18/01/09	05/02/09	Der.	7	Turgente	07/02/09	6:02 AM	1
5	41339	3	Vacía c/cría	17/01/09	05/02/09	Der.	7	Turgente	07/02/09	6:08 AM	1
6	6345	4	Vacía c/cría	30/01/09	19/02/09	Der.	7	Turgente	20/02/09	8:04 AM	1
7	1323	3	Vacía c/cría	21/01/09	21/02/09	Izq.	7	Flácido	22/02/09	4:55 AM	1
8	6443	4	Vacía c/cría	01/01/09	21/02/09	Der.	8	Turgente	22/02/09	5:04 AM	1
9	4916	3	Vacía c/cría	01/01/09	21/02/09	Der.	9	Lig. turgente	22/02/09	4:57 AM	1
10	3568	2	Vacía c/cría		05/03/09	Izq.	8	Flácido	07/03/09	8:06 AM	1
11	909	4	Vacía c/cría	28/01/09	05/03/09	Izq.	7	Turgente	08/03/09	7:05 AM	1
12	6482	4	Vacía c/cría	25/01/09	05/03/09	Der.	7	Turgente	08/03/09	7:13 AM	1
13	2824	4	Vacía c/cría	13/01/09	05/03/09	Der.	7	Lig. turgente	10/03/09	7:12 AM	1
14	1010	4	Vacía c/cría		08/03/09	Der.	7	Turgente	10/03/09	7:50 AM	1
15	1730	2	Vacía c/cría	04/02/09	08/03/09	Der.	8	Flácido	10/03/09	7:15 AM	1
16	2199	4	Vacía c/cría	14/01/09	11/03/09	Der.	7	Flácido	12/03/09	9:15 AM	1
17	1725	3	Vacía c/cría	22/02/09	14/03/09	Der.	7	Turgente	15/03/09	8:03 AM	1
18	2823	4	Vacía c/cría	08/03/09	25/03/09	Der.	8	Turgente	27/03/09	7:13 AM	1
19	1320	3	Vacía c/cría	11/02/09	02/03/09	Der.	8	Turgente	03/03/09	6:26 AM	1
20	6450	4	Vacía c/cría	11/02/09	05/03/09	Der.	7	Turgente	08/03/09	7:59 AM	1
21	2835	2	Vacía c/cría		11/03/09	Izq.	7	Turgente	12/03/09	9:08 AM	1
22	5391	3	Vacía c/cría		12/03/09	Der.	7	Lig. turgente	15/03/09	9:20 AM	1
23	5394	3	Vacía c/cría		12/03/09	Der.	7	Lig. turgente	15/03/09	9:22 AM	1
24	2824	4	Vacía c/cría	23/02/09	15/03/09	Izq.	7	Turgente	16/03/09	7:12 AM	1
25	4190	4	Vacía c/cría		18/03/09	Izq.	7	Lig. turgente	20/03/09	9:30 AM	1
26	2199	4	Vacía c/cría	23/02/09	20/03/09	Izq.	7	Turgente	23/03/09	8:12 AM	1
27	1055	3	Vacía c/cría		29/01/09	Izq.	7	Turgente	30/01/09	6:25 AM	1
28	5693	2	Vacía c/cría		29/01/09	Izq.	7	Turgente	30/01/09	6:27 AM	1
29	5517	2	Vacía c/cría		05/02/09	Izq.	9	Lig. turgente	06/02/09	5:27 AM	1
30	344	4	Vacía c/cría		05/02/09	Izq.	7	Lig. turgente	06/02/09	5:25 AM	1
31	440	4	Vacía c/cría		16/03/09	Izq.	9	Lig. turgente	17/03/09	7:58 AM	1
32	413	4	Vacía c/cría		16/03/09	Izq.	8	Flácido	17/03/09	8:05 AM	1

Características del eyaculado

N°	N° Alpaca macho	Fecha	Tiempo (Min)	Volumen (mL)	Motilidad (%)	Concentración (x 10 ⁶ /mL)
1	2	30/01/2009	10	1	60	142
2	2	07/02/2009	26	6	60	138
3	2	08/02/2009	13	2	60	129
4	2	23/02/2009	15	0.8	60	153
5	2	08/03/2009	29	3	90	162
6	2	09/03/2009	16	1	60	158
7	2	11/03/2009	18	2.5	60	16
8	2	13/03/2009	21	2	60	181
9	2	16/03/2009	11	1	90	160
10	2	18/03/2009	15	1	60	154
11	2	21/03/2009	15	1	80	145
12	2	24/03/2009	19	1.4	70	151
13	2	28/03/2009	23	3.5	70	103
1	4	11/03/2009	37	1	60	71
2	4	18/03/2009	23	1	90	179
3	4	21/03/2009	11	0.5	60	156
4	4	24/03/2009	27	1	60	210
1	12	30/01/2009	17	1.2	60	58
2	12	23/02/2009	24	0.4	60	63
3	12	04/03/2009	22	0.3	60	117
4	12	09/03/2009	25	1	60	135

TEST DE DIFERENCIA DE PROPORCIONES

```

Two-sample test of proportion                                0: Number of obs =      32
                                                           Gnrh: Number of obs =      32
-----
Variable |          Mean   Std. Err.      z    P>|z|    [95% Conf. Interval]
-----+-----
Plasma |           .75   .0765466
Gnrh |           .53125 .0882155
-----+-----
diff |           .21875 .1167962          - .0101664   .4476664
      | under Ho:     .1199543    1.82   0.048
-----
diff = prop(0) - prop(Gnrh)                                z =    1.8236
Ho: diff = 0

```

PRUEBA DE T STUDENT PARA DIFERENCIA DE MEDIAS (TAMAÑO DE FOLICULOS POR TRATAMIENTO)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
0	5	8	.4472136	1	6.758336	9.241664
GnRh	5	8.2	.2	.4472136	7.644711	8.755289
combined	10	8.1	.2333333	.7378648	7.572163	8.627837
diff		-.2	.4898979		-1.329707	.9297067

diff = mean(0) - mean(GnRh) t = -0.4082
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = 0.3469 Pr(|T| > |t|) = 0.6938 Pr(T > t) = 0.6531

PRUEBA DE T STUDENT PARA DIFERENCIA DE MEDIAS (TAMAÑO DE CUERPO LÚTEO POR TRATAMIENTO)

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Plasma	5	15.2	.4898979	1.095445	13.83983	16.56017
GnRh	5	12.6	.9273618	2.073644	10.02523	15.17477
combined	10	13.9	.6574361	2.078995	12.41278	15.38722
diff		2.6	1.048809		.1814425	5.018558

diff = mean(Plasma) - mean(GnRh) t = 2.4790
 Ho: diff = 0 degrees of freedom = 8

Ha: diff < 0 Ha: diff != 0 Ha: diff > 0
 Pr(T < t) = 0.9809 Pr(|T| > |t|) = 0.0382 Pr(T > t) = 0.0191