

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE
GONADOTROPINAS EXÓGENAS (FSH
Y eCG) EN LA RESPUESTA OVÁRICA Y
LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN
ALPACAS (*Vicugna pacos*)**

Teodosio Huanca Mamani

Febrero 2008

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Departamento de Patología Animal

Facultad de Veterinaria de Lugo

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE
GONADOTROPINAS EXÓGENAS (FSH Y eCG EN LA
RESPUESTA OVÁRICA Y LA PRODUCCIÓN DE
EMBRIONES EN ALPACAS (*Vicugna pacos*))**

Teodosio Huanca Mamani

Febrero 2008



UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Patoloxía Animal

Facultade de Veterinaria

Campus universitario, s/n

27002 LUGO (España)

Tel. centraliña: 982 285 900

Tel. directo: 982 252 350 (+ extensión)

Fax 982 252 195

D. PEDRO GARCÍA HERRADÓN, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMA

Que la Tesis Doctoral Titulada "Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*)", de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. Teodosio Huanca Mamani, ha sido realizada en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela bajo su dirección y en opinión del abajo firmante, reúne los requisitos exigidos precisos para optar al Título de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste firmo el presente informe en Lugo a 8 de febrero de 2008.

Fdo. Teodosio Huanca Mamamni

Fdo. Pedro García Herradón

AGRADECIMIENTOS:

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA -España) - Marco colaborativo hacia los INIAs de Iberoamérica – Programa de Doctores, por el apoyo financiero y darme la oportunidad de consolidar mi carrera profesional.

Al Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA-Perú) por las facilidades concedidas para la estancia en España.

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) Por el manejo administrativo y monitoreo de los recursos económicos y en la asignación oportuna.

Al Programa Nacional de Investigación en Camélidos del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), por el apoyo en personal, recursos económicos y animales para la ejecución del presente trabajo.

Al Proyecto INCAGRO por su apoyo con los materiales y productos utilizados dentro del Subproyecto FDSE Biotecnologías Reproductivas 05-0015 – INCAGRO FDSE – UNMSM.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Santiago de Compostela – Facultad de Veterinaria de Lugo – Laboratorio de Reproducción y Obstetricia, por haber contribuido en mi formación profesional. Gracias Galicia – España.

Al Dr. Pedro García Herradón por su acompañamiento como tutor en el presente trabajo, cariño hacia los camélidos sudamericanos, su paciencia y comprensión para lograr la meta dentro del tiempo previsto, Muchas gracias Maestro.

Al Dr. Enrique Gonzáles que en paz descanse, por darme la oportunidad de estar en Galicia, en la Facultad de Veterinaria para realizar mi estudio doctoral

A los Drs. Luis Quintela, Juan Becerra y Ana Peña por su motivación a seguir adelante hasta lograr el objetivo final.

A los colegas con quien compartí los trabajos en el laboratorio Santiago, Juan

A mis grandes amigos que conocí en Lugo: Ricardo Bardales, Javier Añorve, Pascual Ananias y Alonso Roca.

A los grandes amigos y compañeros de trabajo: Elsa Valladares, Mary Rioja, José Almeyda y Cesar Osorio por su apoyo para lograr esta capacitación.

A mi colega Wilfredo Huanca de la UNMSM, por compartir su experiencia y motivar en todo momento a seguir el camino de la superación y estar presente en el mundo de la investigación científica.

A Aida Cordero de la UNA La Molina, por su apoyo invaluable en la ejecución del trabajo y estar presente en los momentos que se requirió.

A mis colegas del Programa Nacional de Investigación en Camélidos, por su apoyo en el trabajo de campo: Oscar Cárdenas, Mario Lino Gonzáles, Nolberto Apaza, Rómulo Sapana, Vilma Luza y Rubén Gálvez.

A todo el personal técnico y trabajadores del CIP Quimsachata

A los alpaqueros que me alentaron a seguir adelante, misión cumplida

A mi esposa Valentina y mis hijos Yuvalena, Maybee, Milagros y Jesús por su paciencia y comprensión por las ausencias a casa y entender la noble misión que debe cumplir el Médico Veterinario en la generación de tecnologías para contribuir al desarrollo de la ganadería alto andina.

A los nuevos integrantes de la familia Víctor y William, los sueños se hacen realidad con trabajo y dedicación.

Para la nueva generación Megan, Diana y Eduardo que son la luz de la esperanza para un futuro mejor.

I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA.....	9
1.- Importancia de los camélidos sudamericanos.....	9
1.1. Social.....	9
1.2. Económica.....	9
1.3. Técnica.....	10
2.- Anatomía del aparato reproductor de la hembra.....	11
3.- Fisiología reproductiva en la hembra.....	12
3.1. Pubertad.....	12
3.2. Patrones reproductivos en las hembras adultas.....	13
3.2.1. Fisiología ovárica de las hembras que no han sido apareadas que no han ovulado.....	13
3.2.2. Fisiología ovárica de las hembras apareadas que no han quedado gestantes.....	16
3.2.3. Actividad Luteal.....	18
3.3. Comportamiento sexual.....	20
3.4. Estacionalidad reproductiva.....	22
3.5. Influencia de la alimentación en la reproducción.....	23
3.6. Gestación.....	23
3.6.1. Reconocimiento maternal de la gestación.....	25
3.6.2. Endocrinología de la gestación.....	26
3.6.3. Diagnóstico de gestación.....	28
3.6.4. Duración de la gestación.....	29
3.6.5. Gemelaridad.....	29
3.7. Parto.....	29
3.8. Puerperio.....	30
4.- Control de la funcionalidad ovárica.....	31
4.1. Control de la dinámica de crecimiento folicular.....	31
4.2. Inducción de la ovulación.....	32
5.- Súper estimulación ovárica.....	33
5.1. Súper estimulación ovárica durante una fase luteal natural.....	34
5.2. Súper estimulación ovárica durante una fase luteal artificial.....	35
5.3. Súper estimulación ovárica aplicada durante la fase de receptividad sexual.....	36
5.4. Supresión mecánica del folículo dominante previo al tratamiento hormonal.....	37
6.- Hormonas utilizadas para inducir superovulación en los camélidos.....	38
6.1. FHS.....	38
6.2. eCG.....	39
7.- Transferencia de embriones.....	40
8.- Influencia del tratamiento superovulatorio en la posterior	

fertilidad de la hembra donante.....	42
9. Criopreservación de embriones.....	42
III. OBJETIVOS	47
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	51
4.1. Área en que se realizó el estudio.....	51
4.2. Animales.....	51
4.3. Tratamientos de superovulación.....	52
4.4. Recuperación de los embriones.....	54
4.5. Transferencia de embriones.....	57
4.6. Evaluación de la fertilidad de las hembras donantes.....	57
4.7. Registro de información.....	58
4.8. Análisis estadístico.....	58
V. RESULTADOS	61
1.- Evaluación de la respuesta ovárica al tratamiento con las hormonas Folículo Estimulante (FSH) y Gonadotropina Coriónica equina (eCG) durante una fase luteal inducida.....	61
1.1.- Respuesta ovárica al tratamiento con FSH y eCG en hembras lactantes y no lactantes.....	61
1.2.- Influencia de la respuesta ovárica al tratamiento hormonal sobre la producción de embriones y calidad de los mismos.....	65
2.- Evaluación del porcentaje de recuperación y las características de los embriones obtenidos tras el lavado uterino a los 7 días de la cópula.....	68
2.1.- Evaluación de la recogida de embriones a los 7 días de la cópula en función de la situación fisiológica de las hembras y de la hormona utilizada.....	68
2.2.- Evaluación de las características de los embriones obtenidos.....	75
3.- Evaluación del porcentaje de gestación tras la transferencia a hembras receptoras.....	77
4.- Evaluación de la posterior eficiencia reproductiva de hembras utilizadas como donante de embriones.....	79
VI. DISCUSIÓN	83
VII. CONCLUSIONES	99
VIII. RESUMEN	103
IX. SUMMARY	106
X. BIBLIOGRAFÍA	111

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Los fósiles encontrados indican que los ancestros de la familia Camelidae se originaron en las grandes llanuras de Norteamérica hace 9-11 millones de años y que se extinguieron durante la edad del hielo. Al final del periodo Terciario, una rama de ésta migro a Eurasia a través del Estrecho de Bering dando lugar al género *Camelus*, que hoy podemos encontrar en África y Asia Central. La otra rama se desplazó a América del Sur durante el Pleistoceno, dando lugar al género *Llama* (Wheeler, 1995). Así, la familia de los camélidos quedó dividida en dos grupos: los del nuevo mundo y los del viejo mundo. En la actualidad, los camélidos del viejo mundo están representados por el dromedario (*Camelus dromedarius*), que habita en los desiertos de Asia y el norte de África, y el camello bactriano (*Camelus bactrianus*), que vive en los desiertos de China y Mongolia (Novoa, 1970). Los camélidos del nuevo mundo, conocidos también como camélidos sudamericanos, están representados por cuatro especies: la llama (*Lama glama*), la alpaca (*Lama pacos*), el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*). De acuerdo con Wheeler (1995), las especies domésticas alpaca y llama derivan de las especies silvestres vicuña y guanaco respectivamente, y todas ellas tienen 37 pares de cromosomas (Taylor y col., 1968).

Las cuatro especies de camélidos pueden cruzarse entre sí y los híbridos obtenidos son fértiles (Gray, 1954). El cruce más común, que recibe la denominación de huarizo, procede de una llama macho y una hembra de alpaca y es bastante apreciado por las características de su vellón. El cruce de un macho de vicuña y una alpaca hembra se denomina pacovicuña produce una fibra muy fina, pero su vellón es escaso y pierde valor con la edad, al incrementarse el porcentaje de pelo.

Se conoce dos razas de alpacas, la Huacaya y la Suri, pero algunos autores señalan que tan solo se trata de dos fenotipos diferentes puesto que el apareamiento de dos animales de raza Huacaya pueden producir un cierto porcentaje de animales Suri y viceversa (Wheeler, 1995),

La población total de camélidos sudamericanos se estima de forma aproximada en 6,8 millones de individuos y está distribuida principalmente por Perú, Bolivia, Chile y Argentina y en menor medida en Estados Unidos y Australia, aunque la población existente en estos dos últimos países está experimentando un notable crecimiento. El Perú cuenta en la actualidad con 3.156.101 alpacas, que representa el 87% de la población mundial, y 1.189.657 llamas.

Las llamas y las alpacas han jugado un importante papel en el desarrollo de la civilización Inca, siendo utilizadas como medio de carga y transporte y para la producción de carne y fibra (Burton y col., 1969). En la actualidad la crianza de los camélidos domésticos constituye una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la población alto andina del Perú. Estos animales han adquirido a lo largo del tiempo una notable capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales existentes en estos territorios. El hábitat natural de la alpaca son los ecosistemas andinos localizados entre los 3 800 y 5 000 metros sobre el nivel del mar, cuyos pastos son muy pobres en nutrientes debido a las condiciones del suelo y la erosión. Las alpacas son capaces de alimentarse en estos pastos, que, además, presentan un elevado contenido en taninos, toleran las bajas temperaturas y las inclemencias meteorológicas y son más resistentes a las infestaciones parasitarias que las vacas y ovejas. Bajo estas condiciones adversas producen fibra de una calidad excepcional y proteínas de origen animal destinadas al consumo humano, en zonas geográficas en las que no es viable la explotación de otras especies domésticas. La fibra producida por las alpacas es un producto muy apreciado por la industria textil por su longitud, suavidad, brillo, resistencia y características termo-estáticas. No obstante, la ausencia de programas de mejora genética y los esquemas de crianza tradicional, basados en apareamientos no programados, y la elevada consanguinidad (30 a 45%) han provocado un deterioro de la calidad genética de los animales, que se refleja en pérdidas en la cantidad y, sobre todo, en la calidad de la fibra producida. Así, en el 46 % de los animales el grosor de la fibra es de 33 micras, en el 45 % de los mismos el grosor medio es de 26 micras, y tan solo un 8% producen una fibra con diámetro medio de 22 micras (Freyre, 2006). Esta situación obliga a poner en marcha de forma urgente un programa de mejora genética orientado a seleccionar y multiplicar a los mejores animales desde un punto de vista productivo, ejemplares con un diámetro de fibra comprendido entre 18 a 21 micras, cuyo número es bastante reducido. Sin embargo, la baja eficiencia reproductiva de estos animales limita considerablemente las posibilidades de difundir este material genético en el conjunto de la población. Las alpacas tienen una tasa de gestación muy baja debido a la elevada mortalidad embrionaria que se produce durante los primeros 35 días de gestación, un prolongado periodo de gestación (345 ± 3 días), una estación reproductiva muy corta (de enero-marzo) y a que no alcanzan un desarrollo corporal adecuado para soportar su primera gestación hasta los 2 años de edad, lo que determina que su primer parto se retrase hasta los 3 años. Además, su vida productiva concluye a la edad de 7 a 8 años, por lo que tan solo producen un total de 4 a 5 crías durante la misma. Por otra parte, existe una elevada incidencia de enfermedades infecciosas y parasitarias, que provocan una elevada mortalidad en las crías, reduciendo el número

de animales destinados a la reposición y la velocidad de progreso genético. Finalmente, los sistemas de manejo reproductivo aplicados en las comunidades alpaqueras se basan en esquemas tradicionales, prescindiendo en muchos casos de la programación de apareamientos.

Esta situación obliga a desarrollar y aplicar tecnologías más avanzadas para acelerar la mejora calidad genética y solventar los factores limitantes que frenan el avance técnico.

La inseminación artificial, criopreservación seminal y todas las técnicas relacionadas con ellas han alcanzado un menor desarrollo en los camélidos que en el resto de las especies domésticas. Ello es consecuencia de la existencia de numerosos factores limitantes entre los que podemos destacar las dificultades para la recogida del semen, su extremada viscosidad y la escasa concentración espermática. Por todo ello, la inseminación artificial con semen fresco tiene una difusión muy escasa y la utilización de semen congelado se encuentra aún en fase de desarrollo, no existiendo posibilidades de aplicación a corto plazo.

La transferencia de embriones ha demostrado ser una poderosa herramienta en los programas de Mejora Genética de muchas especies domésticas, bovinos, ovinos, caprinos y porcinos, al permitir acortar los intervalos generacionales y facilitar la diseminación de las características genéticas ligadas a la producción. Sin embargo, el grado de desarrollo alcanzado por ésta técnica en los camélidos domésticos es notablemente inferior, ello es consecuencia de que la mayor parte de los trabajos en los que se estudia la fisiología reproductiva son relativamente recientes, por lo que los conocimientos existentes son sensiblemente inferiores a las de otras especies de rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos).

El objetivo del presente estudio es contribuir al desarrollo de un procedimiento para inducir ovulaciones múltiples, unido a la transferencia de embriones en los camélidos domésticos sudamericanos, para poder utilizarlo como una herramienta en la mejora genética y en la recuperación de tonalidades de color y de las diferentes variedades. Ello permitirá disponer de una herramienta eficaz para la obtención de un mayor número de embriones viables a partir de las hembras de mayor calidad genética y tras su transferencia al resto de la población de hembras, incrementar sensiblemente el número de descendientes obtenidos a partir de las mismas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

1.- Importancia de los camélidos sudamericanos

1.1. Social

El Perú cuenta en la actualidad con un censo de 3.216.573 alpacas, 1.300.920 llamas y 188.327 vicuñas, cuyas poblaciones están distribuidas por la región alto andina en altitudes superiores los 4.000 metros sobre el nivel del mar. La crianza de estas especies constituye la actividad principal de 350.000 familias campesinas de la zona alto andina, ya que, en esta región, la agricultura es tan solo una actividad complementaria. Sin embargo, estos ganaderos continúan utilizando sistemas de manejo tradicionales, lo que dificulta la obtención de unos resultados productivos competitivos. Así, a pesar de que el Perú alberga al 80% de la población mundial de alpacas, la repercusión en la economía peruana de los productos obtenidos a partir de este camélido es muy poco significativa. No obstante, en los últimos años se ha producido un acelerado desarrollo de una industria textil artesanal, generada por algunas ONGs y para satisfacer las demandas del turismo, que crea numerosos puestos de trabajo al utilizar métodos artesanales para el hilado y tejido (Sumar, 2007).

El Perú es el principal productor de fibra de alpaca, generando el 80% de la oferta mundial, seguido a gran distancia por Bolivia, con un 15%. El resto del mundo produce tan solo el 5% restante, aunque en los últimos años comienza a observarse una notable expansión de la cría de alpacas y de la producción de fibra en países como Australia y Estados Unidos. Australia cuenta ya con unas 200.000 alpacas y en los Estados Unidos su número alcanza una cifra de 28.000 ejemplares. Estos animales han demostrado ser capaces de adaptarse a condiciones ambientales y sistemas de manejo muy diferentes a las existentes en los territorios andinos y de alcanzar producciones elevadas.

1.2. Económica

Dentro de las distintas especies de camélidos, la alpaca es la de mayor importancia económica debido a la calidad de su fibra, que es muy apreciada por la industria textil. No obstante, la repercusión de los productos obtenidos a partir de este camélido en la economía peruana es relativamente pequeña. Los productos procedentes de las alpacas constituyen tan solo el 1,35 % de las exportaciones totales del Perú, representando únicamente el 5% de las exportaciones no tradicionales. Su contribución al Producto Bruto Interno (PBI) manufacturero ha sido cifrada entre el 2%

y el 2,5% en los últimos 10 años (CITE Alpaca, 2006). Las exportaciones de fibra de alpaca suponen para el país unos ingresos anuales de divisas de 1.200.000 dólares USA (IPAC, 2005).

1.3. Técnica

Los primeros trabajos de investigación en camélidos sudamericanos se iniciaron a partir de la década del 60, las alternativas tecnológicas desarrolladas respondían inicialmente a las necesidades de las grandes haciendas, posteriormente a las de las empresas de propiedad social y finalmente a las necesidades de las comunidades campesinas. Sin embargo, los sistemas de cría utilizados están basados mayoritariamente en esquemas tradicionales y tan solo un 10 % de los ganaderos emplea criterios técnicos.

Existen factores de otra índole que dificultan que esta actividad ganadera alcance niveles competitivos. Entre ellos podemos destacar la ausencia de un Programa Nacional de mejora genética y la escasa difusión entre los criadores de las diferentes alternativas tecnológicas. Además, a partir de 1984 se produjo la salida del país de un gran número de ejemplares de alta calidad genética hacia USA, Australia, Nueva Zelanda y otros países del mundo. La venta de estos ejemplares fue consecuencia de los elevados precios que alcanzaban, unida al bajo nivel de renta de sus anteriores propietarios.

Todas estas circunstancias han provocado que más del 70% de los ejemplares presentes en el Perú produzcan una fibra de elevado grosor, siendo muy escasos los reproductores de calidad, por lo que su precio no está al alcance de la mayoría de los criadores. ¿Que podemos hacer en estas circunstancias para aprovechar el potencial genético de los machos y hembras de elevada calidad genética que aún nos quedan? La mejora genética mediante la formación de núcleos de reproductores y la realización de pruebas de progenie requiere muchos años de trabajo y está limitada, entre otros factores, por el largo intervalo generacional y la escasa capacidad reproductiva de la hembra, ya que tan solo produce un máximo de 4-5 crías a lo largo de toda su vida reproductiva (Novoa, 1999). Por lo tanto, es necesario recurrir a otras alternativas como la inducción de ovulaciones múltiples y la transferencia de embriones al objeto de incrementar de forma rápida el número de machos y hembras de calidad genética superior. Ello permitiría acelerar la propagación de los animales seleccionados por sus características morfológicas y por la cantidad y calidad de su fibra.

2.- Anatomía del aparato reproductor de la hembra

El tamaño y la forma de los ovarios varían con la edad y con su contenido en folículos y cuerpos lúteos. Así, su longitud oscila entre los 5 y 12 mm y su peso entre los 1,9 y 2,4 g (Sato y Montoya, 1990; Sumar, 1985). En las hembras multíparas los ovarios son ovalados o circulares y aplanados lateralmente, y presentan una superficie irregular debida a la presencia de numerosos folículos cuyo diámetro está comprendido entre los 3 y 5 mm (Elwishy, 1992). La presencia de folículos maduros y, sobre todo, de cuerpos lúteos le confiere al ovario un aspecto lobulado. Cada ovario está rodeado completamente por un largo pliegue del mesosalpinx con forma cónica denominado *bursa ovarii*, cuya porción apical forma un amplio orificio circular que comunica con la fimbria del oviducto (Bravo, 2000).

Los oviductos son dos conductos delgados y tortuosos, de 15 a 20 cm de longitud, que comunican la superficie del ovario con el útero. Cada oviducto se une a un cuerno uterino a través de un estrecho orificio que forma una papila protuberante. Esta estructura, denominada istmo, actúa como un esfínter para evitar movimientos retrógrados de los fluidos contenidos en el útero (Sumar, 1985). Las funciones del oviducto son diversas, destacando la captación del ovocito proveniente del ovario, el transporte y almacenamiento de los espermatozoides depositados en el útero, proporcionar el ambiente adecuado para que se produzca la fecundación y el inicio del desarrollo embrionario (Sato y Montoya, 1990).

El útero de la alpaca es bicorne, con forma de Y, presentando dos cuernos uterinos con una longitud media de 7,5 cm y un cuerpo muy corto, en las hembras no gestantes el órgano se localiza en el interior de la pelvis (Sato y Montoya, 1990). El aparato genital esta suspendido de las paredes abdominales y pélvicas por amplios ligamentos (Fowler, 1989). El cuerno uterino izquierdo es más grande que el derecho desde la etapa fetal y prepuberal (Tibary y Anouassi, 1997) y esta diferencia se acentúa en las hembras multíparas como consecuencia de que el 98% de las gestaciones tienen lugar en el cuerno izquierdo (Fernández-Baca y col, 1973). La mucosa uterina está formada por un epitelio cilíndrico y la submucosa por un tejido fibroso denso que contiene pequeñas glándulas uterinas (Fowler, 1989). El tono y el edema del útero se incrementan durante la fase folicular, manteniéndose relajado y homogéneo durante la fase luteínica (Tibary, 2001c).

El cérvix es similar al de la vaca, contiene 2 ó 3 pliegues anulares (Sato y Montoya 1990; Smith y col, 1994) y su longitud oscila entre los 2 y 5 cm. El grado de apertura o

cierre está sometido a regulación endocrina, de manera que su luz se dilata durante el celo para facilitar la cópula, mientras que se estrecha durante la gestación para evitar la contaminación del útero mientras se completa el desarrollo embrionario o fetal (Sato y Montoya, 1990). El cérvix protruye en la vagina, formando dos sacos ciegos, uno dorsal y otro ventral.

La longitud de la vagina varía entre 13 y 15 cm y su diámetro esta comprendido entre 3,5 y 5 cm y se caracteriza por tener una mucosa que forma numerosos pliegues (Sumar, 1985; Fowler, 1989). Es una estructura extensible, por lo que a medida que avanza la gestación, el peso del útero ocasiona la desaparición de los mencionados pliegues. El himen, o sus restos, marcan la separación entre la vagina y la vulva. La longitud de la vulva es de unos 3 cm y el clítoris es muy pequeño (Bravo y col, 2000).

3. Fisiología reproductiva en la hembra

3. 1. Pubertad

La mayor parte de las hembras alpaca muestran receptividad sexual entre los 12 y 14 meses, a pesar de haberse comprobado que la actividad ovárica (presencia de folículos con un diámetro superior a los 5 mm) se inicia a edades más tempranas (Novoa y col, 1972; Sumar, 1985). La aparición de la pubertad está supeditada a las condiciones ambientales, especialmente a la situación nutricional. Así, la pubertad se produce cuando el animal alcanza el 60% del peso corporal de un adulto, lo que supone unos 33-36 kg (Sumar, 1985; Smith, 1985). Es muy habitual que no se inicie la primera gestación hasta los 2 años de edad, lo que unido a la tasa de natalidad media es aproximadamente del 50% en estos animales, determina que únicamente la mitad de los mismos produzca su primera cría a los 3 años, mientras que el resto no lo hace hasta los 4 años de edad (Fernández-Baca, 1974). Sin embargo, cuando las condiciones nutricionales son adecuadas es posible lograr que las hembras inicien su primera gestación a los 12 meses de edad, obteniéndose una buena fertilidad (Fernández-Baca, 1972; Novoa y col, 1972). Así, se ha comprobado que cuando las hembras de un año, que presentan buen desarrollo corporal, se mantienen durante 3 días consecutivos con machos adultos (4 a 6 años), es posible alcanzar porcentajes de fertilidad del 96.1%, cifras similares a las obtenidas con hembras adultas (Condorena, 1977).

Las vicuñas y los guanacos también producen su primera cría a los 3 años de edad (Raedeke, 1978) y en el Dromedario (*Camelus dromedarius*). Se describe también un

patrón reproductivo similar, alcanzándose la madurez sexual en edades tardías 3 a 4 años en las hembras y entre 4 y 7 años los machos (Yagil y col, 1984).

3.2. Patrones reproductivos en las hembras adultas.

Los camélidos son especies de ovulación inducida, por lo que una vez alcanzada la madurez sexual su fisiología ovárica está condicionada por la existencia o no de cópula, pudiendo encontrarse en tres situaciones fisiológicas: 1) ausencia de monta y de ovulación; 2) monta y ovulación sin que se inicie la gestación; 3) gestación (Vaughan y Thibary, 2006).

3.2.1. Fisiología ovárica de las hembras apareadas que no han ovulado.

La ecografía ovárica realizada en hembras adultas de las diferentes especies de camélidos, llamas (Adams y col, 1989), alpacas (Vaughan y col, 2004b) y vicuñas (Aguero y col, 2001; Miragaya y col, 2004), indican que en ausencia de cópula los animales muestran oleadas de crecimiento folicular de manera continua, de manera similar a lo observado en otras especies doméstica. Pero, a diferencia de otras especies, en ausencia de copula no se produce la ovulación ni la formación de un cuerpo lúteo, de tal forma que al final de la oleada de crecimiento se produce atresia del folículo dominante (Sumar, 2000). Por lo tanto, en los camélidos resulta más adecuado utilizar el modelo de crecimiento folicular en oleadas que el del ciclo estral. Además, se ha comprobado la existencia de una correlación negativa entre el número de folículos antrales presentes en el ovario y el diámetro que alcanza el folículo de mayor tamaño (Adams y col, 1989; 1990; Aguero y col, 2001, Miragaya y col, 2004; Vaughan y col, 2004). El reclutamiento o emergencia de la oleada se caracteriza por el crecimiento de un grupo de folículos antrales de 2 a 3 mm hasta alcanzar un diámetro de 4 a 5 mm. A partir de este momento se establece la selección, que permite que uno de los folículos continúe creciendo, mientras que el resto sufre atresia (Adams y col, 1989). El folículo dominante inhibe el crecimiento folicular en ambos ovarios, probablemente, a través de la secreción de inhibina (Tibary, 2001b; Tibary y Memon, 1999). Se ha comprobado la existencia de una correlación positiva entre el tamaño del folículo dominante y las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol y urinarias de sulfato de estrona, tanto en alpacas (Aba, 1995; Aba y Forsberg, 1995; Aba y col, 1995; Bravo y col, 1990b), como en llamas (Aba y col, 1995; Bravo, 1994; Bravo y col, 1990b; Chaves y col, 2002). La mayor concentración de estradiol se alcanza cuando el folículo adquiere su diámetro máximo, en las alpacas a los 8 días del inicio de la oleada de crecimiento (Vaughan, 2001a) y en las llamas a los 10-13 días (Chaves y col, 2002).

En ausencia de cópula los niveles plasmáticos de progesterona son inferiores a 1 ng/ml (Aba y col, 1995, Bravo y col, 1990b; 1995b; Ridland y col, 1992). No obstante, en algunas ocasiones los folículos hemorrágicos anovulatorios pueden luteinizarse y producir progesterona en cantidades más elevadas (Tibary, 2001b; Tibary y Memon, 1999).

La velocidad de crecimiento folicular varía en las diferentes especies de camélidos siendo 0,5–0,8 mm/día en llamas (Adams y col, 1989; 1990), 0,43 mm/día en alpacas (Vaughan y col, 2004) y 1,8 mm/día en vicuñas (Aguero y col, 2001; Miragaya y col, 2004). La evolución folicular puede ser dividido en tres fases, fase de crecimiento, fase de madurez, momento en el que se alcanza el diámetro de folículo preovulatorio (7–12 mm), y la fase de regresión, siendo la duración media de cada una de ellas de 4 días en la alpaca (Bravo y Sumar, 1989). Los datos obtenidos en las llamas son muy similares: fase de crecimiento 4,8 días, fase de madurez 5,0 días y fase de regresión 4 días (Bravo y col, 1990a). No obstante el periodo de supervivencia del folículo dominante muestra grandes variaciones de unas oleadas a otras. En las llamas y las alpacas no se ha demostrado la existencia de una asociación temporal entre la elevación de los niveles de FSH y el inicio de la oleada de crecimiento folicular, tal y como se ha descrito en los bovinos (Adams, 1999), por lo que es necesario realizar nuevos estudios utilizando métodos más sensibles para conocer mejor los mecanismos que regulan el reclutamiento en estas especies. Durante la lactación el intervalo entre oleadas de crecimiento folicular se reduce y también lo hace el diámetro máximo alcanzado por el folículo dominante, probablemente, sea una consecuencia del efecto de los elevados niveles de prolactina (Adams y col, 2000).

Algunos autores observaron que los folículos dominantes se distribuyen de forma homogénea entre ambos ovarios (Adams y col, 1992; Bourke y col, 1992b; Bravo y col, 1990b; 1995a; 1995c, Bravo y Sumar, 1989; Fernández-Baca y col, 1970b; San Martín y col, 1968; Vaughan y col, 2003), pero otros indican que el número de folículos presentes en el ovario izquierdo es ligeramente superior al del derecho (Del Campo y col, 1996). No obstante, no siempre se produce alternancia entre ambos ovarios de una oleada a otra (Adams y col, 1990; Bourke y col, 1992b; Vaughan y col, 2004). La presencia de un cuerpo lúteo en el ovario, sea de ciclo o de gestación, no afecta al número de folículos en crecimiento (Del Campo y col, 1996a).

Al cabo de 2 a 3 días del inicio de la atresia del folículo dominante se inicia una nueva oleada de crecimiento folicular (Vaughan, 2001) y en ocasiones se puede producir la coexistencia de dos folículos dominantes, uno en crecimiento y otro en

regresión (Adams y col, 1990). Desde el momento en el que se establece la selección el crecimiento folicular está regulado por la secreción de LH, por ello, los cambios en la concentración de progesterona como consecuencia de la ovulación o de la gestación reducen el intervalo entre oleadas y el tamaño máximo alcanzado por el folículo dominante (Adams y col, 1990). Sin embargo, en las hembras que no ovulan también se produce la regresión del folículo dominante, lo que podría indicar que en estas especies existen mecanismos de regulación intraováricos capaces de controlar la vida del folículo dominante.

En los camélidos se ha descrito la presencia de folículos quísticos (Bravo, 1997; Sumar, 1983) y hemorrágicos (Adams y col, 1991b; Tibary y Anouassi, 1997). Ambas estructuras presentan numerosas similitudes y algunas diferencias, pero se desconocen sus efectos sobre la función reproductiva.

El intervalo entre la emergencia de dos oleadas de crecimiento folicular consecutivas difiere en las distintas especies de camélidos siendo de 12 a 16 días en alpacas (Vaughan y col, 2004), 18 días en llamas (Adams y col, 1990; Chavez y col, 2002) y 4 días en vicuñas (Aguero y col, 2001; Miragaya y col, 2004). No obstante, Bravo y Sumar (1989) y Bravo y col (1990b) observaron que el intervalo entre la presencia de dos folículos dominantes sucesivos era de 11–12 días tanto en alpacas, como llamas. La duración del intervalo entre dos oleadas podría variar con la localización geográfica, la estación del año, la situación fisiológica de la hembra, el método de examen y el número de animales incluidos en el diseño experimental.

El diámetro máximo alcanzado por el folículo dominante es de 8 a 12 mm en las alpacas (Bravo y Sumar 1989; Vaughan y col, 2004) y de 9 a 16 mm en llamas (Adams y col, 1990). Esto podría explicar parcialmente las diferencias observadas entre ambas especies en la duración del intervalo entre dos oleadas consecutivas (Vaughan y col, 2004; Adams y col, 1990). No obstante, no explica el corto intervalo entre oleadas observado en las vicuñas (Miragaya y col, 2004), en las cuales el diámetro máximo del folículo dominante, 6 a 11 mm, es muy similar al de las alpacas.

Cuando los folículos anovulatorios alcanzan un elevado tamaño su persistencia se prolonga, lo que podría indicar que se trata de folículos quísticos o hemorrágicos. Así, se ha comprobado que los folículos quísticos, cuyo diámetro es superior a los 12 mm, pueden mantenerse entre 17 y 31 días (Bravo y col, 1993), y que los folículos hemorrágicos, con un diámetro superior a los 13 mm, se mantienen en el ovario 25 días o más (Adams y col, 1991b).

3.2.2. Fisiología ovárica de las hembras apareadas que no han quedado gestantes.

Los camélidos son especies de ovulación inducida, por lo que, las hembras necesitan estimulación coital para que se produzca la ovulación del folículo dominante y la formación de un cuerpo lúteo (England y col, 1969; Fernández-Baca y col, 1970a; León y col, 1990; Rodríguez, 1959; San Martín y col, 1968). La elevación de los niveles de estradiol asociada al crecimiento folicular no es suficiente para provocar la descarga preovulatoria de LH (Bravo y col, 1990b). Algunos estímulos físicos, auditivos, olfatorios o visuales pueden inducir la ovulación, pero su efectividad es considerablemente inferior a la de los estímulos coitales. En estas circunstancias se habla de ovulaciones espontáneas, siendo su presentación inferior al 5-10% y observándose preferentemente durante el postparto (Fernández-Baca y col, 1970; Bravo y col, 1989).

El primer incremento significativo de los niveles plasmáticos de LH se produce entre 15 y 40 min después del inicio del coito, como consecuencia de un reflejo neuroendocrino (Spies y col, 1997). Los estímulos neuronales que desencadenan dicho reflejo se han relacionado con la estimulación peniana del cérvix, los sonidos emitidos por el macho y el contacto físico (Bravo, 1994; Fernández-Baca y col, 1970a) y recientemente, con la presencia en el semen de un factor inductor de la ovulación (Adams y Ratto, 2001; Chen y col, 1985). En un estudio realizado por Fernández-Baca y col (1970a) se demostró que la cópula con machos enteros o vasectomizados provocaba la ovulación 77-82%, mientras que en los casos en los que se producía la monta sin intromisión el número de ovulaciones eran muy bajo.

El pico de LH se presenta a las 2 ó 3 horas de la monta, retornando a niveles basales al cabo de 7 a 12 horas de la misma (Aba, 1998; Aba y Forsberg, 1995; Aba y col, 1995; 1999; Bravo y col, 1990a; 1991b; Bravo y col, 1992).

La descarga de LH como respuesta a la cópula está condicionada por el tamaño del folículo dominante (Bravo y col, 1991b). Cuando los folículos tienen un diámetro entre 4 y 5 mm, la cantidad de LH secretada es muy inferior y no se produce la ovulación. Esta situación parece ser consecuencia de que los folículos de pequeño tamaño no son capaces de producir suficiente cantidad de estradiol para sensibilizar al eje hipotálamo hipofisario (Bravo y col, 1991b). Sin embargo, Aba y Forsberg (1995a), no encontraron ninguna correlación entre los niveles plasmáticos de estradiol (rango 5 a 41 pmol/l) y la cantidad de LH liberada en respuesta a la administración de GnRH (0.2 µg/kg de peso vivo) en alpacas y llamas.

Para que se produzca la ovulación como respuesta al coito es necesario que el folículo dominante tenga un diámetro superior a los 6 mm y se encuentre en fase de crecimiento (Adams y col, 1990), cuando el diámetro folicular es menor o el folículo se encuentra en regresión, no se produce la ovulación (Bravo y col, 1991).

La existencia de cópulas repetidas en un intervalo de 6 a 24 h no determina un incremento significativo en la amplitud de la descarga preovulatoria de LH (Bravo y col, 1992). Por ello, estos autores sugieren que el eje hipotálamo-hipofisario podría manifestar un periodo refractario, que posiblemente sería consecuencia de la depleción de LH hipofisaria o de una disminución en el número de receptores hipofisarios para la GnRH. England y col (1969) observaron que el contenido hipofisario en LH era bajo a los 4 días del coito y que sus niveles se recuperaban a los 8 días del mismo.

El intervalo entre la cópula y la ovulación es aproximadamente de 30 h (rango de 24 a 48 h) en la alpaca y la llama (Adams y Ratto, 2001; Huanca y col, 2001; San Martín y col, 1968). Adams y col (1990) observaron que el intervalo entre la cópula y la ovulación es bastante constante en las llamas, de tal forma que el 96% de los animales ovularon en el transcurso del segundo día posterior al coito y solamente un 4% lo hizo en el tercer día. No se ha observado ninguna influencia del tamaño del folículo dominante en el intervalo cópula-ovulación (Adams y col, 1990; Sumar y col, 1993a). Sin embargo, se ha comprobado que la velocidad de crecimiento del folículo dominante desde la monta hasta la ovulación depende del tamaño del mismo. Cuando su diámetro estaba comprendido entre 7 y 9 mm su crecimiento fue de 0,6 a 1 mm/día, mientras que los folículos con un diámetro entre 10 y 12 mm solamente crecían 0,2 mm/día (Adams y col, 1990).

Las ovulaciones tienen lugar en ambos ovarios con una frecuencia similar, a pesar de que la mayor parte de las gestaciones se localicen en el cuerno izquierdo (Bravo y col, 1993; 1995c; Fernández-Baca y col, 1970a; 1973). Tampoco se ha podido comprobar que el ovario de procedencia del ovocito tenga ningún efecto en la probabilidad de que se produzca una gestación (Vaughan y col, 2003).

En estas especies las ovulaciones múltiples son muy raras y su frecuencia está comprendida entre el 5 y 15% (Bravo y col, 1993; Fernández-Baca y col, 1970a). Sin embargo, no se ha descrito la existencia de ningún nacimiento múltiple en su hábitat natural (Fernández Baca, 1974; San Martín y col, 1968; Fernández- Baca y col, 1968).

La descarga preovulatoria de LH altera la estructura y función del folículo preovulatorio antes de que se produzca la ovulación, provocando la maduración del ovocito, la expansión de las células del cúmulo y la ruptura de la pared folicular (Khatir y col, 2004; 2005). Además, se produce un cambio en la secreción de esteroides, observándose un aumento de los niveles de estradiol tras la descarga de LH (Vivanco 1985), pasando de 100-200 pgr/ml a más de 700 pgr/ml (Sumar, 1996), para descender posteriormente a partir de las 18 horas de la cópula (Bravo y col, 1990a).

La ovulación espontánea, definida como la ruptura del folículo y formación de un cuerpo lúteo en ausencia de un estímulo coital, es poco frecuente, aunque un estudio realizado en alpacas señala que se produce en el 3,5% de los folículos mayores de 6 mm (Bravo y Sumar, 1989). Esta situación tiene lugar cuando existe contacto físico con machos o hembras, en situaciones en las que existe estrés asociado al manejo y durante la manipulación del tracto genital o la ecografía transrectal (Bourke y col, 1995a; Chaves y col, 2002; Ratto y col, 1997; Sumar, 1994). En algunos estudios en los que se aplicó la laparoscopia, se observó la luteinización de los folículos sin que existiera ovulación previa (Bravo y Sumar, 1989; Pollard y col, 1994; Tibary y Memon 1999)

3.2.3. Actividad Luteal

El cuerpo lúteo se desarrolla en el ovario a los 5 días de la cópula (2 a 4 días después de la ovulación), localizándose en el punto de ovulación (Adams y col, 1989; 1990; 1991a; Sumar y Bravo, 1991), observándose una elevación de los niveles de progesterona entre 4 y 6 días después del coito (Aba y col, 1995a; Sumar y García, 1986). El cuerpo lúteo alcanza su tamaño máximo (10 a 15 mm) entre 8 días después del coito, coincidiendo con los niveles máximos de progesterona (Aba y col, 1995a; Adams y col, 1991a). A partir de los 4 días de la ovulación puede visualizarse el cuerpo lúteo con relativa facilidad utilizando ecografía transrectal y aparece como una estructura de ecogenidad media con una zona central muy ecogénica. Algunos cuerpos lúteos presentan una cavidad central, no ecogénica, repleta de líquido cuyo diámetro oscila entre 3 a 8 mm (Adams y col, 1991a). En ausencia de gestación la vida del cuerpo lúteo es muy corta, 8 a 9 días, al cabo de los cuales se inicia su regresión, reduciéndose su diámetro a la mitad a los 12 días del coito, al tiempo que desciende la secreción de progesterona, alcanzando su nivel más bajo en los días 14 ó 15 (Adams y col, 1989; 1990; 1992b; Fernández-Baca y col, 1970a; Sumar y Bravo, 1991; Sumar y col, 1988a). Cuando no existe gestación, las hembras vuelven a mostrar receptividad sexual 12 a 14 días después de la última cópula.

La actividad secretora del cuerpo lúteo de los camélidos puede determinarse a través de los niveles plasmáticos de progesterona o los niveles urinarios de glucuronato de pregnanodiol, ya que se ha comprobado que los cambios en las concentraciones de ambas sustancias son paralelos a las variaciones en el tamaño del cuerpo lúteo (Bravo, 1994; 1991b; England y col, 1969; Fernández-Baca y col, 1970a). Algunos autores señalan que la existencia de unos niveles plasmáticos de progesterona superiores 0,32 ng/ml (1 nmol/l) (Sumar y col, 1988) indican de la existencia de un cuerpo lúteo funcional, mientras que otros establecen unos valores mínimos de 2 ng/ml (6,4 nmol/l) (Adams y col, 1991a).

Se ha descrito la existencia de fases luteales cortas, con una duración de tan solo 4 días, tanto en las llamas como en las alpacas (Sumar y col, 1988a). La aplicación de la ecografía ha permitido comprobar que los folículos en regresión pueden transformarse en folículos anovulatorios luteinizados, caracterizados por una gran cavidad central, cuya vida media aproximada es de 5 días (Bravo y col, 1991a). Estos autores señalan que los folículos en regresión han perdido la capacidad de secretar los factores necesarios para que se produzca la ovulación, pero son capaces de luteinizarse.

La existencia de un cuerpo lúteo funcional no interrumpe las oleadas de crecimiento folicular, de manera que a los pocos días de la ovulación se forma un nuevo folículo dominante (Adams y col, 1990). Sin embargo, la presencia de progesterona reduce el crecimiento folicular, de tal manera que el número de folículos que inician el crecimiento y el diámetro alcanzado por el folículo dominante son más reducidos. Sin embargo, el intervalo entre oleadas no sufre ninguna modificación (Adams y col, 1990).

La regresión del cuerpo lúteo es consecuencia de la secreción endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que llega a la circulación sistémica a través de las venas uterinas (Aba y col, 2000), no se ha aclarado aún la intervención de la oxitocina en la luteolisis en los camélidos. Un hecho curioso observado en los camélidos es que el cuerno uterino izquierdo tiene un efecto luteolítico local y sistémico, mientras que el efecto luteolítico del cuerno derecho solamente es local, por lo tanto, solo afecta al ovario derecho (Fernández-Baca y col, 1979). Esta diferencia en la actividad luteolítica ha sido relacionada con la anatomía vascular del útero, el oviducto y los ovarios, observándose que en el 90% de las hembras la arteria uterina derecha es más gruesa y presenta ramificaciones que irrigan el cuerno izquierdo, mientras que la vena uterina izquierda presenta un diámetro superior. Ello ha llevado a sospechar de la existencia de conexiones arteriovenosas que permiten al cuerno izquierdo influir sobre la actividad

funcional del ovario derecho (Del Campo y col, 1996b).

Los cambios en la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se han analizado determinado la concentración de sus metabolitos más estables (PGFM , 3,14 dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ o 15-ceto-dihidro- $\text{PGF}_{2\alpha}$) (Aba y col, 2000; Skidmore y col, 1996a; 1998). Las concentraciones de PGFM permanecen en niveles basales (200 pmol/l) durante el inicio de la fase luteal y comienzan a elevarse a los 7 días del coito (Aba y col, 2000). Entre los días 8 y 12 aumenta la amplitud de los pulsos (800–1200 pmol/l en llamas y 600 pmol/l en alpacas) (Aba y col, 1995b; 2000; Sumar y col, 1988a).

No existen evidencias de la existencia de pseudo gestación en los camélidos como sucede en otras especies de ovulación inducida (England y col, 1969; Fernández-Baca y col, 1970a; Adams y col, 1991a). Sin embargo, Adam y col (1989) observaron que algunas llamas cubiertas presentaban elevadas concentraciones de progesterona en el día 60 a pesar de no estar gestantes, lo que fue atribuido a la existencia de un cuerpo lúteo persistente.

3.3. Comportamiento sexual

Los camélidos domésticos, alpacas y llamas, al ser especies de ovulación inducida no presentan ciclos estrales definidos, no obstante, existen periodos de receptividad sexual. Estos periodos son bastante prolongados durante la época de apareamiento y en ausencia de machos pueden durar hasta los 36 días presentando breves interrupciones que no sobrepasan las 48 horas (San Martín y col, 1968). A medida que avanza la estación reproductiva la intensidad del estro, el número de hembras receptivas se reducen (England y col, 1971). La receptividad sexual no está siempre asociada con la presencia de un folículo dominante (Sumar y col, 1993; Bravo y col, 1994).

El comportamiento observado durante la etapa de receptividad sexual puede dividirse en cortejo y monta. La fase de cortejo se inicia cuando un macho sexualmente activo entra en contacto con una hembra, tiene una duración variable dependiendo de la libido y fortaleza del macho, oscilando entre unos segundos hasta los 10 min y cesa cuando se produce la monta o el macho comprueba que es rechazado (England y col, 1971). Cuando la hembra está receptiva adopta una posición de decúbito esternal en presencia del macho o en las proximidades de una pareja que está copulando, formándose en ocasiones grupos de hembras en posición decúbito esternal (Fernández-Baca y col, 1970a; Novoa, 1970). Algunas hembras montan a otras que están echadas,

ejecutando movimientos pélvicos similares a los machos (San Martín y col, 1968; Fernández Baca y col, 1970b), pero dicho estímulo no es suficiente para inducir la ovulación (Fernández-Baca y col, 1970b). Cuando una hembra no receptiva es perseguida por un macho, trata de escapar por todos los medios y se defiende pateando y escupiendo (Fernández-Baca y col, 1968; Raedeke y col, 1978).

Los camélidos son los únicos ungulados que se aparean en decúbito esternal. La hembra adopta durante la cópula una actitud pasiva y en ocasiones se dispone en decúbito lateral (Sumar y Adams, 1997). El macho se coloca sobre la hembra y sitúa sus metatarsos lateralmente a los de la hembra (Novoa, 1970). Los machos muestran su excitación con temblores de las orejas, movimientos de la cola, dilatación de los orificios nasales y la emisión de sonidos guturales denominados "orgling" (Novoa, 1970). Algunos autores consideran que estos sonidos intervienen en la descarga preovulatoria de LH (Bravo, 1994; Guilbride y Moro, 1965).

Durante la cópula el macho maniobra su pene alrededor de la vulva hasta ubicar la vagina, atraviesa el cérvix, con movimientos suaves hasta llegar a uno de los cuernos uterinos, para ir posteriormente cambiando sucesivamente de un cuerno a otro a lo largo de la eyaculación (Franco y col, 1981). El movimiento del pene en el interior del útero provoca en el endometrio inflamación, edema e hiperemia (Bravo y col, 1996a; Velásquez y col, 1999).

La duración media de la cópula suele ser de 20 a 30 minutos, aunque el rango es muy amplio variando entre 5 y 65 min (England y col, 1971; Sumar, 1985; Fernández Baca, 1993). La duración de la cópula está influida por diversos factores: número de machos presentes de manera simultánea, edad de las hembras, jerarquía dentro del rebaño, hora del día, estación del año, etc. (Escobar, 1984; Knight y col, 1992; Pollard y col, 1999; Vaughan, 2001).

No existe unanimidad en cuanto a la influencia de la duración de la cópula en el desencadenamiento de la ovulación. Así, algunos autores indican que las cópulas de 5 minutos de duración son efectivas para inducir la ovulación (Pollard y col, 1991), mientras que otros señalan que deben superar los 12 min (Parraguez y col, 1997). No existen signos externos indicativos del momento en que ocurre la eyaculación (Novoa, 1991).

Durante los meses de febrero a marzo algunas alpacas continúan en celo después de la cópula aceptando nuevamente al macho hasta 24 h después. Es probable que las

hembras que no ovulan, por presentar folículos de reducido diámetro, continúen en celo hasta desarrollar folículos capaces de responder al estímulo inductor de la ovulación y algunas hembras que ovulan siguen manifestando receptividad sexual hasta que el cuerpo lúteo inicia su actividad secretora (Fernández Baca y col, 1970b), momento a partir del cual desaparecen los signos de celo.

3.4. Estacionalidad reproductiva

Existen opiniones contradictorias en relación a la existencia o no de estacionalidad reproductiva en los camélidos sudamericanos, lo que podría indicar que su patrón reproductivo está influido tanto por las condiciones ambientales, como por las de manejo a que son sometidos. En su habitat natural tienen un comportamiento estacional, de tal manera, que los partos se producen entre enero y abril. Esta época del año coincide con las condiciones ambientales, son más favorables, al ser los meses más templados y lluviosos y durante los cuales existe una mayor disponibilidad de pastos (Koford, 1957; San Martín y col, 1968; Franklin, 1983; Sumar 1985). Sin embargo, en el hemisferio norte las llamas y alpacas se reproducen a lo largo de todo el año (Schmidt 1973; Johnson, 1988) y en Nueva Zelanda se reproducen tanto en los meses de primavera, como durante el otoño (Pollard y col, 1995). Algunos estudios indican que la actividad sexual de los machos disminuye durante la primavera (Pollard y col, 1995).

La fisiología reproductiva de la alpaca está supeditada al manejo que reciben los animales. Así, en los rebaños de las comunidades campesinas, en los que generalmente se mantienen los machos y las hembras agrupados a lo largo de todo el año, las alpacas paren únicamente entre los meses de enero y abril. En cambio, cuando no hay asociación permanente entre hembras y machos y se los junta periódicamente, los apareamientos y la gestación ocurren en meses diferentes a los antes señalados (Fernández-Baca y col, 1968; Fernández-Baca y col, 1993; Novoa, 1991). El continuo agrupamiento de machos y hembras ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad sexual de los primeros, pudiendo ocasionar, incluso, la completa desaparición de la libido (Sumar, 1985; 1996). Sin embargo, estos recuperan su actividad sexual de manera inmediata cuando son introducidos a un nuevo rebaño de hembras (Fernández-Baca y col, 1972b). Por el contrario, cuando existe completa separación de machos y hembras y solamente se permite la cópula de forma esporádica (por ejemplo una vez al mes) ambos sexos se mantienen sexualmente activos durante todo el año (Sumar, 1985) y los partos pueden producirse en cualquier época del mismo (San Martín y col, 1968; Huanaco y col, 1986; Laguna, 1986).

La estación del año tiene muy poca influencia en la ovulación, fertilidad y supervivencia embrionaria (Fernández-Baca y col, 1972a), aunque en Nueva Zelanda las alpacas demostraron menor receptividad sexual durante la primavera (Pollard y col, 1995) y en Norteamérica las llamas presentan menor fertilidad durante el verano (Johnston, 1988).

No se conocen los mecanismos que regulan la estacionalidad sexual de las hembras o la inhibición de la libido del macho como consecuencia del contacto continuo con hembras. Sin embargo, se considera que podrían intervenir algunos factores como la nutrición, la temperatura, la humedad y las horas de luz, así como estímulos visuales u olfativos, por su capacidad para influir en los centros nerviosos que controlan el comportamiento reproductivo (Brown, 2000).

La estación influye también en la duración de la gestación y el peso de las crías en el momento del nacimiento. Así, en un estudio realizado con alpacas en Nueva Zelanda se ha comprobado que la gestación se alarga en primavera y se acorta en otoño (Davis y col, 1997). Además, las crías nacidas durante el otoño pesaban 1 kg más que las nacidas en primavera (Davis y col, 1997).

3.5. Influencia de la alimentación en la reproducción

Tal y como hemos señalado previamente, la edad al primer servicio está condicionada por la pubertad y el desarrollo corporal, que depende a su vez de la disponibilidad de recursos forrajeros. En régimen extensivo, las hembras reciben generalmente su primer servicio a los 2 años de edad, y en caso de que el desarrollo corporal sea deficiente se retrasa hasta los tres años. Sin embargo, cuando los animales se alimentan en praderas cultivadas se acelera la velocidad de crecimiento, es posible realizar el primer servicio a los 12 meses de edad (Larico, 1987).

3.6. Gestación.

Los acontecimientos asociados con la maduración del ovocito, la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la fecundación no han sido estudiados en los camélidos de manera detallada, por lo que, se asume que son similares a los descritos en otras especies domésticas.

El desarrollo embrionario es muy rápido, de tal forma que a los 4 días del coito aparecen en el oviducto embriones de 4 a 8 células en el oviducto (Bravo y col, 1996a).

Los embriones llegan al cuerno uterino a los 5-6 días de la ovulación en forma de blastocistos en eclosión o recién eclosionados (Del Campo y col, 1995a; McKinnon y Tinson, 1992), comienzan a elongarse entre los días 9 y 10 y se establece un estrecho contacto entre el trofoblasto y el endometrio en el día 12 de gestación (Tibary, 2001a).

A pesar de que el porcentaje de ovocitos fecundados es muy elevado en estas especies (70% a 80%), entre un 25 y un 50% de los embriones mueren durante los primeros 30 días de gestación, sin que se conozca su causa (Fernández-Baca y col, 1970a). Una de las probables razones de esta elevada mortalidad embrionaria es la incapacidad del cuerno uterino derecho para soportar la gestación. A pesar de que ambos ovarios contribuyen de manera similar a la producción de ovocitos, muy pocos de los embriones implantados en el cuerno derecho son capaces de sobrevivir al día 30 de gestación y ninguno consigue sobrevivir a partir del día 87 (Fernández-Baca y col, 1970b). En este mismo estudio se comprobó que el número de gestaciones originadas por embriones procedentes del cuerno derecho, que migran al izquierdo y se implantan en él es bastante reducido. No obstante, en un estudio posterior se observó que la mitad de las gestaciones establecidas en el cuerno izquierdo estaban soportadas por un cuerpo lúteo localizado en el ovario derecho (Fernández-Baca y col, 1979). Esto podría indicar que la mortalidad embrionaria afecta a los embriones procedentes de ambos cuernos de manera similar. A pesar de que exista migración del cuerno derecho al izquierdo, la ausencia de un embrión en dicho cuerno podría contribuir a la regresión del cuerpo lúteo, especialmente si la migración se retrasa con respecto al momento del reconocimiento maternal de la gestación. Tampoco podemos descartar la existencia de diferencias entre ambos cuernos en el mecanismo implicado de reconocimiento maternal de la gestación.

Recientemente se ha descrito la anatomía macro y microscópica de la placenta de la alpaca (Olivera y col, 2003). La implantación parece iniciarse en el día 14 post-ovulación comenzando en el cuerno izquierdo, para posteriormente extenderse al derecho (Olivera y col, 2003) y las interdigitaciones entre las células epiteliales del útero y el trofoblasto embrionario se observan solamente en el cuerno uterino izquierdo, en regiones próximas al embrión. Estas zonas han sido descritas en dromedarios y permiten los primeros intercambios materno-fetales y el reconocimiento maternal de la gestación (Abd-Elnaeim y col, 1999; Skidmore y col, 1996).

Las interdigitaciones aumentan en profundidad y complejidad a medida que la gestación avanza, facilitando el intercambio gaseoso entre la madre y el feto (Fowler y Olander, 1990; Olivera y col, 2003). Las zonas de contacto entre el trofoblasto y el

endometrio presentan una capa altamente glicosilada que podría jugar un papel destacado en el proceso de adhesión (Abd-Elnaeim y col, 1999; Jones y col, 2000; Jones y col, 2002). Existen evidencias de una intensa actividad biosintética y de intercambio de gases y nutrientes en sentido bidireccional, pero no se ha demostrado la existencia de áreas específicas de intercambio (Oliveira y col, 2003).

El trofoblasto de las alpacas presenta células binucleadas y multinucleadas, cuyo número se incrementa a medida que avanza la gestación, aunque se desconoce su función (Jones y col, 2002; Oliveira y col, 2003). Es posible que dichas células estén relacionadas con la secreción de citoquinas y factores de crecimiento necesarios para la implantación y placentación. La placenta de los camélidos ha sido clasificada dentro de la categoría de epiteliocorial y no presenta zonas específicas de fijación (cotiledones) como otras especies de rumiantes. El epitelio del córion muestra numerosas proyecciones semicirculares que se unen a sus correspondientes depresiones en la mucosa uterina (Stevens y col, 1980; Fowler, 1989; Smith, 1985).

Durante la gestación disminuye el tono uterino y aumenta la curvatura ventral de los cuernos. Los camélidos son la única especie en la que existe una membrana fetal extra, que deriva de la epidermis y recubre la totalidad de la superficie fetal fijándose a las mucosas de la nariz, labios, ojos, ano, prepucio y vulva (Fowler y Olander, 1990). La función de esta membrana es desconocida, pero podría jugar un papel lubricante en el momento del parto facilitando la salida del feto, debido a que en estas especies la cantidad de fluidos es muy escasa.

3.6.1. Reconocimiento maternal de la gestación.

Tal y como hemos señalado previamente, en los camélidos, el 98% de las gestaciones se localizan en el cuerno uterino izquierdo, a pesar de que los cuerpos lúteos de gestación se distribuyan de forma homogénea en ambos ovarios (Bravo y Varela, 1993; Fernández-Baca y col, 1973). Esta situación indica la existencia de un patrón diferencial en relación con la luteolisis, lo que podría explicar que los embriones que inician su vida en el cuerno derecho deban migrar al izquierdo para evitar la luteolisis. Se desconoce la naturaleza de las señales que intervienen en el reconocimiento maternal de la gestación en estas especies, pero deberán emitirse entre los días 9 y 13 de gestación para contrarrestar el efecto luteolítico de la $PGF2_\alpha$. Los blastocistos de los rumiantes producen interferon-Tau que suprime la expresión génica de los receptores para los estrógenos y la oxitocina en el epitelio uterino y evita la

liberación de prostaglandinas (Bazer y col, 1996). No obstante, Leaman y Roberts (1992) no encontraron interferon-Tau en las llamas.

El estradiol es otro posible candidato para actuar como señal en el reconocimiento maternal de la gestación en llamas y alpacas. Así en la especie porcina, el reconocimiento maternal de la gestación se produce entre los días 11 y 12, cuando los blastocistos comienzan a producir estrógenos y cambian de forma esférica a filamentosa (Bazer y Thatcher, 1977; Bazer, 1992). Además, la administración de estrógenos entre los días 11 y 15 del ciclo estral provoca un significativo alargamiento de la vida del cuerpo lúteo (Geisert y col, 1982). Algunos estudios realizados en dromedarios demuestran que los blastocistos presentan una elevada actividad aromatasa y sintetizan grandes cantidades de estrona y estradiol entre los días 10 y 33 (Skidmore y col, 1994). El principal estrógeno producido por los blastocistos de camello fue el estradiol, en contraste con los blastocistos de la especie porcina y equina que producen preferentemente estrona (Perry y col, 1973; Heap y col, 1982). En un estudio reciente realizado por Powell y col (2007), se ha demostrado que los blastocistos de llama producen cantidades crecientes de 17β -estradiol entre los días 7 y 15 de gestación, observándose un marcado incremento entre los días 11 y 13, momento en el que cambia la forma del blastocisto de oval a alargada. Esta actividad secretora coincide con el momento de la luteolisis, por lo que, podría ser la primera señal para el reconocimiento maternal de la gestación en las llamas y las alpacas, los blastocistos que inician su desarrollo en el cuerno derecho deben migrar al izquierdo para continuar su desarrollo. En la cerda (Pope y col, 1982b) y en la yegua (Ginther, 1984), se ha demostrado que la producción de estrógenos por los blastocistos se incrementa durante la migración intrauterina. Además, el estradiol producido por los blastocistos de los camélidos podría intervenir en la migración del embrión al cuerno contralateral, al provocar un incremento local de la contractilidad miometrial. Además, la administración en llamas de inyecciones diarias de 10 mg de benzoato de estradiol entre los días 7 y 15, provoca un retraso en la luteolisis y el mantenimiento de la secreción de progesterona (Powell y col, 2007).

3.6.2. Endocrinología de la gestación

Durante los primeros 8 días de gestación, el desarrollo del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona son similares en las hembras gestantes y no gestantes. Posteriormente entre los días 8 y 12, se observa un ligero descenso temporal en los niveles de progesterona, coincidiendo con el momento del reconocimiento maternal de la gestación (Aba y col, 1997; Aba y col, 1995a; Adams y col, 1991a; England y col,

1969; Fernández-Baca y col, 1970a; Sumar y col, 1993a). En esta especie, el cuerpo lúteo es necesario durante la totalidad de la gestación (Sumar, 1988) y su eliminación o la administración de PGF_{2α} o de sus análogos provocan la interrupción de la gestación a las 24-72 horas en cualquier etapa de la misma (Memon y Stevens, 1997; Smith y col, 2000; Sumar, 1988a). Por otra parte, la eliminación del embrión determina que se produzca la luteolisis al cabo de 4 y 7 días (Adam y col, 1992a).

Los niveles de progesterona se mantienen por encima de los 2 ng/ml durante toda la gestación, presentando ligeras fluctuaciones (Bravo y col, 1996b; Ridland y col, 1992), para reducirse de forma ligera durante las dos últimas semanas de gestación y de forma abrupta 24 horas antes del parto (Aba, 1998; León y col, 1990). Sin embargo, otros autores no observaron el descenso gradual durante los últimos 15 días de gestación, aunque señalan la existencia de una brusca reducción 72 horas antes del parto (Raggi y col, 1999). En esta especie existen elevadas concentraciones de circulantes de 20α-dihidroprogesterona, aunque se desconoce su significado fisiológico (Fernández-Baca y col, 1970a).

Los elevados niveles de progesterona presente durante la gestación provocan una reducción del número de folículos en crecimiento, de la velocidad del mismo y del diámetro máximo alcanzado por el folículo dominante (Adams y col, 1990). El examen postmortem de los ovarios de las alpacas gestantes ha permitido observar la presencia de folículos anovulatorios, con un diámetro de 6 a 12 mm, hasta los 6 meses de gestación (Aba, 1995; Aba y col, 1997). A partir del séptimo mes solamente aparecen folículos cuyo diámetro no supera los 4 mm, lo que indica una inhibición del crecimiento folicular (Bravo y Varela, 1993).

Los niveles plasmáticos de estradiol son bajos al comienzo de la gestación, se van elevando progresivamente en el transcurso de la misma, alcanzan valores muy altos durante el último mes y sufren un brusco descenso cuando se produce la disrupción de la unidad fetoplacentaria (Aba y col, 1995a; Aba y col, 1998; Aba y col, 1999). Estas variaciones en los niveles de estradiol pueden ser los responsables de las modificaciones en el patrón de crecimiento folicular, debido al retrocontrol negativo que ejercen sobre la secreción de FSH y podrían ser utilizados para monitorizar la viabilidad fetal (Aba y col, 1998).

3.6.3. Diagnóstico de gestación

La técnica más comúnmente utilizada por los ganaderos para el diagnóstico de gestación es el comportamiento de las hembras en presencia de un macho sexualmente activo (Fernández-Baca y col, 1974). Este método es un buen indicador, pero su certeza no es absoluta. Algunas de las hembras que rechazan al macho no están gestantes, por haber sufrido mortalidad embrionaria y no haberse completado la regresión del cuerpo lúteo (Alarcón y col, 1990). Además, algunas hembras muy sumisas aceptan la cópula a pesar de estar gestantes, especialmente cuando el macho es muy agresivo (Bourke, 1998).

La monitorización de la concentración de progesterona en la sangre, orina o leche durante los 30 días posteriores al apareamiento permite el diagnóstico de gestación, pero es un método impreciso debido a que algunas hembras no gestantes pueden presentar un cuerpo lúteo persistente (Adán y col, 1989)

La palpación rectal ha sido utilizada por los Veterinarios para el diagnóstico de preñez a partir de los 35 días, sin embargo, se requiere mucha experiencia, por lo que es recomendable retrasarla hasta los 45-50 días (Alarcón y col, 1990). También puede emplearse la palpación abdominal, pero en este caso solamente es posible el diagnóstico de gestación durante el último tercio de la misma, pudiéndose lograr en esta caso una exactitud del 95 - 100 % tanto en alpacas, como en llamas (Alarcón y col, 1990).

Actualmente se utiliza la ecografía transrectal, que permite diagnosticar la gestación con gran precisión entre los días 19 y 28 (Bourke y col, 1992a), aunque algunos trabajos señalan que es posible determinar la presencia de la vesícula embrionaria a partir del día 13 (Bravo y col, 1989). Nuestra experiencia nos permite afirmar que es posible realizar el diagnóstico sin mucho esfuerzo a partir de los 18 días de gestación.

Debido a la elevada mortalidad embrionaria y fetal existente en esta especie, es aconsejable confirmar que la gestación se mantiene una vez superado el primer trimestre.

3.6.4. Duración de la gestación

La duración media de la gestación varía de unos autores a otros y ha sido cifrada entre 325 y 361 días para las alpacas (San Martín y col, 1968) y entre 331 y 361 días para las llamas (Sumar, 1988a). Este amplio rango es consecuencia de que la duración de la preñez está sujeta a factores estacionales (Vaughan, 2001a) e individuales (Davis, 1999). Sin embargo, el número de partos y el sexo de la cría no parecen influir en la duración de la gestación (Sumar, 1985).

3.6.5. Gemelaridad

Cuando los camélidos se encuentran en su ambiente natural los partos múltiples son muy raros (Adams, 1997; Fowler, 1990; Sumar, 1985). En un estudio realizado por San Martín y col (1968) en la estación experimental de La Raya, en el que se analizaron 12.000 partos, no se observó ningún parto múltiple. Sin embargo, esta situación podría ser consecuencia de la alimentación y el manejo, puesto que, en Norteamérica se ha documentado la existencia de partos dobles tanto en llamas como en alpacas (Adams, 1997; Fowler, 1990).

Dado que en los camélidos sudamericanos existe un cierto porcentaje de ovulaciones dobles, es probable que exista algún mecanismo para reducir el número de fetos. Además, se ha observado que en muchas gestaciones simples existen varios cuerpos lúteos en los ovarios (Fernández Baca y col, 1970).

3.7. Parto

Al concluir el periodo de la gestación la hembra se separa del rebaño, orina con frecuencia y muestra signos de intranquilidad acostándose y levantándose de manera repetida. El periodo de dilatación dura de 2 a 6 h, el de expulsión del feto de 30 a 60 min y la expulsión de la placenta se produce al cabo de 1 a 2 horas (Bourke, 1998; Fowler, 1989). El neonato pesa entre 7 y 8 kg en el momento de su nacimiento. La mayor parte de los partos se producen en presentación anterior y las distocias son poco frecuentes 2-5% y suelen ser consecuencia de anomalías en la presentación o posición del feto (Brown, 2000).

El momento del parto parece estar regulado por el fotoperiodo, de tal forma que en su hábitat natural la mayoría de los partos se producen entre las 7 y las 14 horas, con un pico a las 9 horas (Sumar, 1983; Sumar, 1985). Esto podría indicar la existencia

de un mecanismo de adaptación, ya que al producirse la mayor parte de los partos en las primeras horas de la mañana, las crías nacen en las horas en las que la temperatura ambiental es más elevada. Además, algunos autores han comprobado que cuando las condiciones son desfavorables, los camélidos pueden retrasar el momento del parto (Reiner y col, 1987; Sumar y col, 1978).

3.8. Puerperio

La involución uterina es muy rápida en los camélidos debido a la existencia de una placenta difusa, completándose en los 15 a 20 días posteriores al parto y, en condiciones normales, nunca se observa descarga uterina durante este proceso (Sumar y col, 1972). A las 24 horas del parto se ha producido ya una considerable reducción del volumen uterino y 10 días después el peso del útero tan solo es el doble de un útero completamente involucionado (Sumar y col, 1972).

Algunas hembras presentan comportamiento de celo a las 24 horas del parto, pero la actividad ovárica no se reinicia hasta 5 a 7 días después del mismo (Aba y col, 1998; Sumar y col, 1972) y a partir de los 10 días la mayoría de las hembras aceptan al macho y son capaces de ovular con normalidad (Bravo y col, 1991a). No obstante, al analizar las oleadas de crecimiento folicular, podemos comprobar que el número de folículos y el diámetro alcanzado por el folículo dominante, aumentan de forma progresiva al avanzar el puerperio (Bravo y col, 1995a).

La tasa de concepción aumenta a medida que avanza el postparto, por lo que es aconsejable retrasar la primera monta hasta los 15-20 días del mismo (Sumar y col, 1972). En un estudio realizado en llamas se comprobó que las tasas de gestación obtenidas cuando la primera monta se realizó en los días 10, 20 y 30 del postparto fueron 21, 61 y 61% respectivamente (Bravo y col, 1994). La posible explicación de estas diferencias habría que buscarla en el ambiente uterino, ya que a los 10 días del postparto el útero todavía no ha completado su proceso de involución (Bravo y col, 1994).

En el momento del parto los niveles de progesterona descienden a niveles basales, mientras que los de cortisol sufren un ligero incremento asociado al parto (Novoa, 1991). Los niveles de estrógenos permanecen elevados en el momento del parto y durante el postparto temprano (Bravo y col, 1995a), lo que podría explicar la receptividad sexual observada en algunas hembras a las 24 horas del parto (San Martín y col, 1968; Sumar y col, 1972). Posteriormente se produce un descenso en la

concentración plasmática de estradiol, para volver a elevarse en el momento en el que se reinicia la actividad ovárica (Bravo y col, 1991b).

4. Control de la funcionalidad ovárica

4.1. Control de la dinámica de crecimiento folicular

Los camélidos sudamericanos se caracterizan por ser especies de ovulación inducida, siendo necesario que se produzca la cópula para que tenga lugar la descarga de LH desencadenante de la ovulación. Por ello, en ausencia del estímulo desencadenante de la ovulación, se producen sucesivas oleadas de crecimiento folicular, maduración y regresión (Vaughan y Tibary, 2006). La sincronización de las oleadas de crecimiento folicular se realiza con tres objetivos:

1. Asegurar la presencia de un folículo preovulatorio en el momento de la monta o de la inseminación artificial.

2. Asegurarnos de que un tratamiento superovulatorio se inicia durante el comienzo de una oleada de crecimiento folicular y en ausencia de un folículo dominante.

3. Sincronizar el ciclo de la hembra donante y las receptoras en un programa de transferencia de embriones.

La progesterona y los progestágenos han demostrado ser bastante eficaces en el control y sincronización de las oleadas de crecimiento folicular en diferentes especies (Lauderdale y Zimbelman, 1974). La progesterona secretada durante una fase luteal o durante la gestación altera la dinámica de crecimiento folicular, reduciendo el tamaño alcanzado por el folículo dominante y acortando la duración de la oleada en las llamas (Adams y col, 1990). Diversos autores han investigado la posibilidad de inducir y sincronizar el inicio de una oleada de crecimiento folicular utilizando progesterona o progestágenos, bien solos o combinados con estrógenos.

La administración de 50 mg diarios de progesterona durante 13 días consecutivos, altera la dinámica de crecimiento folicular y provoca el inicio de una nueva oleada a los 7 días de finalizar el tratamiento (Alberio y Aller 1996). Otros autores han comprobado que la administración conjunta de 25 mg de progesterona y 1 mg de 17 β -estradiol provocan un efecto similar, apareciendo un nuevo folículo dominante a los $7,7 \pm 0,5$

días de la conclusión del tratamiento (Ratto y col, 2003). La aplicación de dispositivos intravaginales impregnados con 0,33 g de progesterona (CIDR) durante 7 días provocó la supresión del crecimiento folicular por encima de los 7 mm y la aparición de una nueva oleada de crecimiento folicular a los $5,0 \pm 1,0$ días de la finalización del tratamiento (Chaves y col, 2002). Mientras que el tratamiento durante 9 días con esponjas intravaginales impregnadas con diferentes cantidades de acetato de medroxiprogesterona produjo resultados variables (Aba y col, 1999; Ferrer y col, 1999).

Solamente existe un estudio en el que se haya utilizado únicamente estradiol para el control de la dinámica de crecimiento folicular en alpacas (D'Occhio y col, 1997). La administración de una dosis de 0,5 o 2 mg indujo regresión del folículo dominante y una nueva oleada de crecimiento folicular con el desarrollo de un nuevo folículo preovulatorio al cabo de 10 a 12 días del tratamiento.

Otro método utilizado para la sincronización de las oleadas de crecimiento folicular se basa en la inducción de la ovulación del folículo dominante administrando LH, lo que permite el desarrollo de un nuevo folículo dominante al cabo de $5,2 \pm 0,5$ días de tratamiento (Ratto y col, 2003).

Recientemente, se ha comprobado que la ablación de los folículos cuyo diámetro supera los 5 mm permite sincronizar las oleadas de crecimiento folicular. Esta técnica se basa en la eliminación del efecto inhibitor del folículo dominante, por lo que su eliminación permite la emergencia de una nueva oleada de crecimiento folicular y el desarrollo de un nuevo folículo dominante al cabo de $5,0 \pm 0,5$ días (Ratto y col, 2003). No obstante, este método es invasivo, puede provocar hemorragias y no resulta de fácil aplicación en condiciones de campo.

4.2. Inducción de la ovulación

Para inducir la ovulación en las alpacas y las llamas se recurre a la administración de hormonas con actividad de LH. La más comúnmente utilizada es la Gonodotropina Coriónica humana hGC, a unas dosis que varían desde 10 a 1 600 U.I. En el caso de las alpacas son suficientes 750 UI de hCG para inducir ovulación en la mayor parte de los animales (San Martín y col, 1968; Fernández-Baca y col, 1970a; Ladrix, 1992; Bourke y col, 1995a). Existen algunos estudios en los que se ha comprobado que la administración de GnRH, es eficaz para provocar la liberación endógena de LH (San Martín y col, 1968; England y col, 1969; Fernández Baca y col, 1970a; Adán y col,

1989; Bourke y col, 1992b; 1995a; Bravo y col, 1992). Sin embargo, para que esta hormona sea capaz de inducir la ovulación es necesario utilizar concentraciones superiores a los 1000 µg (Bravo y col, 1992, Ladrix y col, 1992; Huanca y col, 2001). Cuando se emplean análogos sintéticos de la GnRH, como la buserelina, las dosis necesarias para inducir la ovulación son notablemente inferiores (8 µg) (Bourke y col, 1992b; 1995a). La ovulación se produce generalmente a las 26 h de la inyección de hCG (San Martín y col, 1968; Novoa, 1970) y a las 28 h de la aplicación de GnRH (Bourke y col, 1992b).

La estación del año influye significativamente en la respuesta a los productos administrados. Así, durante el mes de enero se puede provocar la ovulación con dosis reducidas de hCG (250-500 UI), mientras que durante los meses de abril y mayo es necesario emplear concentraciones superiores (England y Foote, 1969). No obstante, para conseguir que se produzca la ovulación entre el 90 y el 100% de los animales es necesario utilizar dosis comprendidas entre las 500 y 750 UI (Adams y col, 1989).

La respuesta a la GnRH, está condicionada por los niveles endógenos de estrógenos y el grado de desarrollo del folículo dominante. Por ello algunos autores son capaces de inducir la ovulación con 750 µg de GnRH (Correa y col, 1997), mientras que otros indican que son necesarios 1000 µg (Bravo y col, 1992). Para que se produzca la ovulación en las alpacas y las llamas, el folículo dominante deberá haber alcanzado un diámetro superior a los 7 mm y estar en fase de crecimiento. Cuando los folículos son de menor tamaño no se produce la ovulación y si el folículo dominante está en fase de regresión se produce la luteinización del mismo (Bravo y col, 1991).

La estimulación mecánica de la vagina y el cérvix no induce la ovulación en los camellos, los dromedarios y las alpacas (Bravo y col, 2000), sin embargo, cuando se deposita semen entero en la porción anterior de la vagina se produce la ovulación (Chen y col, 1985). Posteriormente se ha comprobado que la inyección intramuscular de plasma seminal provoca la ovulación en llamas y alpacas (Sumar y col, 1986; Adams y col, 2001). Ello ha llevado a la identificación de una proteína, denominada factor inductor de la ovulación, presente en el semen de los camélidos

5. Súper estimulación ovárica

La súper estimulación ovárica consiste en inducir el crecimiento, maduración y ovulación de un gran número de folículos de manera simultánea. Sin embargo, los

camélidos presentan algunas diferencias fisiológicas respecto a otras especies domésticas ha tener en cuenta al aplicar estos tratamientos:

1. Estas especies no presentan fases luteales espontáneas.
2. El folículo dominante permanece activo durante periodos prolongados en las hembras no gestantes.

Para que los tratamientos hormonales de estimulación ovárica consigan los objetivos marcados es necesario iniciarlos durante una fase luteal y en ausencia de un folículo dominante (Bourke y col, 1995; Monniaux y col, 1983). En un estudio realizado por Velásquez y col (1999), se evaluó el efecto de la eCG durante la fase folicular y luteínica, comprobándose que la efectividad era mayor cuando se aplicaba en la segunda etapa del ciclo. Así, al aplicar la hormona durante la fase folicular se obtuvieron $8,2 \pm 2,3$ cuerpos lúteos, mientras que al hacerlo durante la fase luteal el número medio de cuerpos lúteos fue de $17,8 \pm 8,3$. Los tratamientos súper ovulatorios se basan en la administración de gonadotropinas (gonadotropina coriónica equina – eCG- o de hormona folículo estimulante –FSH-) tras la sincronización de la oleada de crecimiento folicular durante una fase luteal natural (obtenida mediante la inducción de la ovulación) o una fase luteal artificial (mediante la administración exógena de progesterona). Para garantizar la ausencia de un folículo dominante se recurre a la exploración ecográfica del ovario o a la eliminación del mismo.

La estimulación hormonal del ovario incrementa el número de folículos reclutados al comienzo de cada oleada de crecimiento folicular. Sin embargo, cuando los folículos son reclutados mediante este procedimiento su velocidad de crecimiento es mayor y la maduración de los ovocitos se acelera, lo que provoca que algunos de los ovocitos liberados muestren diversos grados de inmadurez nuclear o citoplásmica que pueden repercutir negativamente en la fecundación y al desarrollo embrionario (Sirard y col, 1992). Estos factores, así como el efecto de los tratamientos sobre el transporte de gametos, no han sido evaluados en los camélidos sudamericanos.

5.1. Súper estimulación ovárica durante una fase luteal natural

La inducción de la ovulación del folículo dominante y la formación de un cuerpo lúteo se consigue mediante la administración de hCG o de análogos de la GnRH (buserelina o deslorelina). A los 7 días de la inducción de la ovulación se administró una inyección intramuscular de 1 000 UI de eCG y posteriormente se provocó la lisis del

cuerpo lúteo, mediante la administración de un análogo de la $PGF_{2\alpha}$ en el día 9. Cuando los folículos alcanzaron un diámetro de 9 mm se inyectaron 750 IU de hCG para provocar la ovulación (Bourke y col, 1992a; Bourke y col, 1995a). El número de embriones obtenidos utilizando este tratamiento en llamas fue muy variable y se situaba en un rango comprendido entre 0 y 6.

5.2. Súper estimulación ovárica durante una fase luteal artificial

Cuando se utiliza este procedimiento, el tratamiento de estimulación ovárica se inició durante una fase luteal artificial o al final de la misma, provocada mediante la administración diaria de progesterona durante 7 a 13 días (Alberio y Aller, 1996), un implante subcutáneo de progestágeno (3 mg de norgestomet) (Bourke y col, 1992b; 1995a), el uso de un dispositivo intravaginal (CIDR) (Chaves y col, 1998, 2002), o la inserción intravaginal de esponjas impregnadas de acetato de medroxiprogesterona (Aba y col, 1999).

La utilización de implantes subcutáneos de norgestomet durante un periodo de 7 días (Bourke y col, 1992b; 1995a), combinada con una dosis de 1 000 UI de eCG en una única aplicación, administrada en el día 5 permitía obtener una buena respuesta ovárica (6,1 folículos de media con un rango de 0–13). Sin embargo, el número de embriones recuperados fue bajo (1,3 embriones por donante, rango de 0–4). Cuando se aplicó este mismo protocolo utilizando un CIDR, la respuesta ovárica fue similar, pero mejoró el número de embriones recuperados (2,0 embriones por llama con un rango de 1 a 3) (Bourke y col, 1992b). La utilización de este mismo protocolo seguido de 500 UI de eCG o 50 mg de pFSH (durante 4 días en dosis decrecientes) provocó el crecimiento de $5,94 \pm 1,71$ folículos y permitió obtener $1,9 \pm 2,7$ embriones por donante (Agüero y col, 2001). Los trabajos de investigación realizados demuestran que la inserción de un dispositivo intravaginal en cualquier etapa del ciclo inhibe el desarrollo folicular, lo que se pone de manifiesto por la ausencia de folículos con un diámetro superior a los 6 mm a los 5 días de la inserción del dispositivo (Chaves y col, 2002).

Otro protocolo de tratamiento utilizado fue la administración de una inyección de benzoato de estradiol, seguida de la aplicación de un CIDR durante 8 días, al final de este periodo se administraron 1 200 UI de eCG obteniéndose respuesta ovárica en un 80% de las hembras tratadas. El número medio de folículos, cuerpos lúteos y embriones recuperados fue de $4,2 \pm 1,9$, $2,1 \pm 1,4$ y $1,8 \pm 2,0$, respectivamente, considerando únicamente las hembras que respondieron al tratamiento (Aller y col, 2002b).

En alpacas, se ha comprobado que la administración de 1 000 UI de eCG al final de un tratamiento con CIDR produjo mayor respuesta ovárica, determinada en base al número de cuerpos lúteos, que el tratamiento en fase folicular (Velásquez y Novoa, 1999). Además, las hembras tratadas con eCG sin realizar un tratamiento previo con progesterona, presentaron una mayor incidencia de folículos quísticos.

En las vicuñas, se ha logrado la estimulación ovárica mediante la administración de 700 UI de eCG en ausencia de folículos dominantes (determinada mediante ecografía) o en animales tratados previamente durante 5 días con CIDR (Aba y col, 2005). La respuesta ovárica (número de folículos y de cuerpos lúteos) por hembra tratada fue de $22,75 \pm 4,26$. A pesar de que las diferencias observadas entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas, el número de folículos fue mayor en los animales tratados con CIDR. En esta misma especie se ha utilizado, también un tratamiento combinado de esponjas de acetato de medroxiprogesterona (60 mg), con una inyección de benzoato de estradiol, antes de la administración de 750 UI de eCG. La respuesta ovárica total (folículos y cuerpos lúteos) determinada a los 7 días de la ovulación fue de $6,7 \pm 2,9$ (Aller y col, 2002a).

5.3. Súper estimulación ovárica aplicada durante la fase de receptividad sexual

Los tratamientos de superestimulación ovárica se han llevado a cabo, también, en llamas y alpacas durante la fase folicular, iniciando la administración de hormonas cuando las hembras presentaban comportamiento de celo durante varios días consecutivos (Correa y col, 1997; Ratto y col, 1997, Velásquez y Novoa, 1999; Huanca y col, 1999).

Correa y col (1997) compararon los resultados obtenidos al administrar pFSH (220 mg en dosis decrecientes), eCG (500 UI) o la combinación de eCG y pFSH (500 UI y 156 mg). Los mayores porcentajes de ovulación se obtuvieron en los animales tratados con pFSH en dosis decrecientes ($7,3 \pm 3,1$), mientras que en los animales tratados con eCG sola o combinada con pFSH se observaron numerosos folículos con un diámetro superior a los 10 mm en el momento del lavado del útero. Estos resultados demostraban que se puede lograr una respuesta ovárica satisfactoria administrando el tratamiento hormonal durante el estro conductual y que FSH resulta más eficaz que la eCG para inducir la superovulación (Correa y col, 1997). Por su parte, Ratto y col, (1997) utilizaron múltiples dosis de pFSH (un total de 200 mg repartidos en 5 días), observando que retrasando la monta con respecto al final del tratamiento hasta las 36

horas se produce un incremento de la respuesta ovárica (número medio de cuerpos lúteos $13,8 \pm 2,7$), pero el número de embriones recuperados no se veía incrementado. El incremento de la dosis de gonadotropinas produce mayor respuesta ovárica, pero no permite incrementar el número de embriones recuperados, lo que sugiere la existencia de interferencias en el transporte de los gametos.

En un estudio realizado en alpacas por Huanca y col (1999), se aplicaron dos protocolos de tratamiento, iniciando ambos durante la etapa de receptividad sexual. El primero de ellos (T1) consistió en administrar 750 UI de hCG el día 0, seguido de 300 UI de eCG durante tres días consecutivos (d8, d9, d10), finalmente se inyectaron 750 UI de hCG en el día 11, para inducir la ovulación. El segundo tratamiento (T2) consistió en administrar 300 UI eCG durante tres días consecutivos (d8, d9, d10). En ambos grupos se practicaron dos montas con machos fértiles. A los 7 días se evaluó la respuesta ovárica, pudiéndose observar que el número de cuerpos lúteos en los ovarios derecho e izquierdo era mayor en el grupo T1 ($4,1 \pm 1,7$ y $3,6 \pm 2,1$) que en el T2 ($2,0 \pm 2,2$ y $1,6 \pm 1,7$ respectivamente). Por el contrario, el número de folículos con un diámetro superior a 10 mm fue inferior en el T1 ($2,3 \pm 1,9$ y $1,7 \pm 1,5$) que en el T2 ($4,4 \pm 2,5$ y $3,8 \pm 3,1$), de tal forma que el primero de los tratamientos permitió obtener una mejor respuesta ovulatoria en las alpacas.

Otro protocolo aplicado en alpacas durante la época de receptividad sexual consistió en administrar 250 UI de eCG y una pequeña dosis de pFSH (dosis total 8,75 mg) en cantidades de decrecientes mediante inyección en la submucosa vulvar, obteniendo 4,75 embriones por hembra tratada (Palomino, 1986). La utilización de esta ruta de administración dificulta la comparación de estos resultados con los obtenidos en otros estudios.

La respuesta de las alpacas a un tratamiento superovulatorio aplicado durante el periodo del celo es mayor cuando los animales han desarrollado un cuerpo lúteo en el ciclo anterior (Leyva y col, 1999a). Este hecho podría indicar que la progesterona endógena aumenta la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisiario, favoreciendo la secreción de gonadotropinas (Leyva y col, 1999).

5.4. Supresión mecánica del folículo dominante previo al tratamiento hormonal.

Existen algunos estudios en los que se ha realizado una doble eliminación del folículo dominante, con un intervalo de 12 días, mediante compresión transrectal antes

del inicio del tratamiento con oFSH (Ovagen), administrando dos inyecciones diarias durante 3 días en concentraciones decrecientes (1,76, 1,32 y 0,88 mg) (Sansinena y col, 2003). Este procedimiento permitió obtener una elevada cantidad de ovocitos maduros mediante laparotomía o aspiración trasvaginal guiada por ecografía, para ser utilizados en la transferencia nuclear (Sansinena y col, 2003) o para la inyección intracitoplasmática (Sansinena y col, 2007).

Los resultados anteriormente expuestos indican que la respuesta a los tratamientos súper estimulatorios es extremadamente variable. Ello podría ser debido a las diferencias en la naturaleza y dosis de las gonadotropinas utilizadas, en la vía de administración, en la etapa de la oleada folicular en el momento de iniciar el tratamiento, en la duración del tratamiento y a factores fisiológicos individuales. El tratamiento previo con progesterona permite obtener una mejor respuesta, independientemente del momento del inicio del tratamiento.

Diversos estudios indican que la utilización de dosis elevadas de eCG provoca un incremento de la incidencia de quistes foliculares (Bravo y col, 1995c). También se ha comprobado que la combinación de eCG (500 IU) con pFSH (50 mg) provoca una disminución de la expresión del celo, situación que podría ser debida a la existencia de ovulaciones asincrónicas o a la luteinización prematura de algunos folículos en el transcurso del tratamiento (Agüero y col, 2001).

6.- Hormonas utilizadas para inducir superovulación en los camélidos.

Los protocolos de estimulación ovárica utilizados en camélidos se basan en la administración de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) o de la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG).

6.1. FHS

La FSH es una hormona glucoproteica cuyo peso molecular es de 37.300 Daltons (Grimek y col, 1979). Esta compuesta por dos subunidades, una subunidad α que es estructuralmente similar a la LH y una subunidad β responsable de su actividad biológica específica. Además, tiene un componente característico de carbohidratos constituido por azúcares neutros, hexosaminas y un bajo contenido en ácido siálico. Este último aspecto sprovoca que su vida media sea muy corto, aproximadamente de 110 minutos (Moor y col, 1984), lo que obliga a realizar aplicaciones repetidas para conseguir una buena estimulación ovárica.

Esta hormona es sintetizada por las células basófilas de la región central de la adenohipófisis y su principal función en la hembra, es inducir el crecimiento folicular estimulando la proliferación de las células de la granulosa de folículos antrales (Monniaux y col, 1983), las cuales presentan receptores específicos para esta hormona. La FSH, por si sola, no estimula la secreción de estrógenos en el ovario, sino que para ello necesita de la presencia de LH (Hafez y Hafez, 2002)

En las hembras de los camelidos los niveles basales de FSH han sido establecidos en valores próximos a los 5 ng/ml. No obstante, en algunas etapas del ciclo alcanza valores de 15-20 ng/ml manteniéndose durante 5-6 días (Bravo y col, 1988).

6.2. eCG

Esta hormona fue descubierta por Cole y Hart en 1930 al comprobar que la administración de suero de yegua gestante a un grupo de ratas estimulaba el crecimiento folicular e incrementaba la tasa de ovulación, estableciendo así la base del tratamiento superovulatorio. Esta hormona es una glucoproteína presente en grandes cantidades en el suero de yegua entre los días 46 y 130 de gestación y presenta en una misma molécula actividades biológicas propias de la FSH y de la LH (Papkoff, 1978; González-Mencio y col, 1978). Los preparados comerciales se obtienen a partir de la purificación del suero recogido a yeguas gestantes y su posterior liofilización. Su potencia se expresa en unidades internacionales, siendo la actividad gonadotrófica específica de 1 UI igual a 0,25 mg de una preparación estándar mantenida por la Organización Mundial de la Salud.

La molécula está compuesta por dos subunidades una α y otra β . La primera es la responsable de las actividades FSH y LH, mientras que la subunidad β determina la amplitud de su actividad. El alto contenido en ácido siálico de la molécula de eCG le confiere una larga vida media, que supera ampliamente a las de la FSH y la LH. Su vida media se cifra en torno a las 40 horas, aunque puede llegar a persistir hasta 10 días (Schams y col, 1978). Esto permite inducir la respuesta superovulatoria con una única administración, habiéndose demostrado que las administraciones múltiples no mejoran la tasa de ovulación (Hafez y col, 2002).

Las principales ventajas de la utilización de eCG en los tratamientos superovulatorios son su bajo costo y que una única administración permite obtener buena respuesta ovárica. Sin embargo, esta prolongada vida media provoca también algunos inconvenientes ya que continúa estimulando el crecimiento folicular después de

producirse la ovulación lo que provoca la existencia de elevadas concentraciones de estradiol durante la fase luteal, alterando la migración y el desarrollo embrionario y modificando el ambiente uterino (Roche e Ireland, 1984). Por el contrario, cuando se aplica FSH los folículos presentes en el ovario después de la ovulación son muy escasos (Lauria y col, 1982).

Existen diversos estudios en los que se ha comparado el efecto de ambas gonadotropinas en la estimulación ovárica de los camélidos domésticos, obteniéndose resultados variables. Algunos trabajos realizados en llamas indican que no existen diferencias en la tasa de respuesta ovárica a ambas sustancias $17,9 \pm 2,2$ folículos tras el tratamiento con FSH y $17,7 \pm 2,2$ folículos en las tratadas con eCG (Ratto y col, 2005). Sin embargo, otros autores señalan que el tratamiento con pFSH permite obtener mejores resultados que la eCG cuando se evalúan el número de folículos que crecen y el número de cuerpos lúteos formados tras la ovulación (Correa y col, 1997).

El efecto de estas hormonas podría estar condicionado por la especie. Así, en un trabajo en el que se compara la respuesta de las alpacas y las llamas sometidas a la estimulación ovárica con eCG, iniciando el tratamiento durante la emergencia de las ondas de crecimiento folicular, se comprueba que en las llamas se produjo el desarrollo de $12,8 \pm 1,4$ folículos y $8,1 \pm 1,0$ cuerpos lúteos, mientras que en las alpacas solamente se desarrollaron $7,5 \pm 1,2$ folículos y $5,9 \pm 1,3$ cuerpos lúteos (Huanca y col, 2006).

La dosis de eCG mas adecuada para conseguir la superovulación en las alpacas ha sido establecida entre 500 y 750 UI, seguida de 750 UI de hCG para inducir la ovulación (Novoa y col, 1999). El empleo de dosis superiores determina un considerable incremento de la frecuencia de aparición de folículos quísticos (Bravo y col, 1995c).

7. Transferencia de embriones.

Los primeros datos relativos a la recogida de embriones en una alpaca superestimulada utilizando el lavado retrógrado del oviducto se remontan a 1968 (Novoa y Sumar, 1968). Algunos años más tarde se publicó el nacimiento de la primera cría de alpaca obtenida mediante transferencia de embriones (Sumar y Franco, 1974). Estos investigadores utilizaron procedimientos quirúrgicos tanto para la obtención de los embriones, como para su posterior transferencia a las receptoras. Posteriormente se desarrollaron métodos no quirúrgicos para la recogida y transferencia de embriones que

fueron inicialmente aplicados en llamas permitiendo el nacimiento de una cría viva tras 326 días de gestación (Wilson Wiepz y Chapman, 1985).

En todos los programas de transferencia de embriones el grado de sincronía entre el ciclo de la donante y las receptoras condiciona la supervivencia embrionaria. En la mayor parte de los experimentos de transferencia llevados a cabo, las receptoras son tratadas con hCG o un análogo de la GnRH (buserelina) para sincronizar su ovulación con la de la donante (Wiepz y Chapman, 1985; Bourke y col, 1992b; 1995a; Palomino Martorell, 1996a; Aller y col, 2002b). No se ha obtenido ninguna gestación utilizando un implante de progesterona combinado con la administración de buserelina (Bourke y col, 1992b). Posteriormente, es necesario verificar que se ha producido la ovulación empleando la ecografía y se procede a la recogida de los embriones 6 a 8 días después de la ovulación (Bourke y col, 1995b).

La técnica no quirúrgica utilizada en camélidos para la recuperación de los embriones es similar a la descrita en vacuno y consiste en lavar los cuernos uterinos con PBS de Dulbecco's (Huanca y col, 2004). Los resultados en cuanto a porcentajes de recuperación en base al número de cuerpos lúteos presentes en el ovario han sido descritos recientemente por Huanca y col (2006) siendo de $4,8 \pm 0,9$ (66,1%) en llamas y de $1,6 \pm 0,3$ (23,6 %) en alpacas. Algunos autores han realizado la recogida de embriones en hembras no superovuladas obteniendo una tasa de recuperación de 79% (Taylor y col, 2001).

Existen grandes variaciones en la respuesta de las donantes a los tratamientos de inducción de ovulaciones múltiples y en la cantidad y calidad de los embriones recuperados (Del Campo y col, 1995). La mayor parte de los embriones recuperados se encuentran en fase de blastocisto eclosionado y su diámetro medio es de $527,1 \pm 168,0$ μm en llamas y de $534 \pm 151,4$ μm en alpacas (Del Campo y col, 2002). El 35% de embriones recolectados en las llamas eran de tamaño pequeño (<450 μm de diámetro), el 40% de tamaño mediano (451 a 650 μm) y un 24% de un tamaño grande (> 651 μm) esta distribución fue similar en las alpacas (Del Campo y col, 2002). (Bourke y col, 1992b) señalan que únicamente es posible obtener mórulas cuando se realiza el lavado del oviducto 3 días después de la inseminación.

Con respecto a las tasas de gestación conseguidas tras la transferencia de embriones, los resultados son muy variables, siendo más abundantes los trabajos realizados con llamas que los que utilizan alpacas. Los valores obtenidos oscilan entre el 0 (Aller y col, 2002b; Bourke y col, 1992b) y el 50% (Bourke y col, 1995b). Los

resultados obtenidos recientemente por Huanca y col (2006) señalan una tasa de gestación del 68,9 % en llamas y del 30,0 % en alpacas.

Todos los embriones se implantan en el cuerno uterino izquierdo independientemente del lugar en que se realice la transferencia y en ninguna de las receptoras a las que se transfirieron dos embriones se produjo una gestación gemelar (Bourke y col, 1995b).

8.- Influencia del tratamiento superovulatorio en la posterior fertilidad de la hembra donante

Las hembras donantes recuperan rápidamente la normalidad de su aparato genital, ya que la ecografía permite comprobar que el aspecto del útero es normal a las 3 semanas del lavado y con un único servicio se logro una tasa de gestación del 40 % (Huanca y col, 2006). En un estudio realizado por Franco y col (2001) con 10 alpacas de fertilidad comprobada sometidas a superovulación y posterior recuperación de embriones utilizando un procedimiento quirúrgico se pudo comprobar que el 70% de los animales quedaron gestantes en un breve periodo. Estas observaciones nos permiten afirmar que el tratamiento superovulatorio, el manejo y el lavado uterino tienen escasa influencia en la fertilidad de las donantes, pudiendo ser utilizadas como reproductoras a partir de la tercera semana.

9. Criopreservación de embriones.

Se han realizado algunos intentos para criopreservar embriones de camélidos domésticos con resultados variables. Palasz y col (2000) analizaron el efecto de la exposición de los embriones de llama de 13 días a diferentes crioprotectores penetrantes para determinar su toxicidad. Los embriones fueron sometidos durante 15 min a soluciones con un 10% de etilenglicol, propilenglicol o glicerol. Posteriormente eliminó el crioprotector con una solución de sacarosa 0,5 M y finalmente se cultivaron durante 24 horas. Los resultados obtenidos indicaron los mayores porcentajes de supervivencia se lograban utilizando etilenglicol (95%) o propilenglicol (94%), mientras que la supervivencia de los embriones sometidos a glicerol era significativamente menor (75%), en un experimento posterior, en el que se realizó la congelación de los embriones, pudieron comprobar que todos los embriones congelados en etilenglicol se re-expandían durante el cultivo, mientras que no lo hizo ninguno de los embriones congelados con propilenglicol (Palasz y col, 2000). Por ello, estos autores recomiendan

la utilización de etilenglicol como crioprotector para realizar la congelación de los embriones de estas especies.

La vitrificación ha sido realizada con éxito para la criopreservación embrionaria en las diferentes especies animales y ofrece grandes ventajas debido a la simplicidad del método ya que evita la cristalización del agua. Este procedimiento implica la utilización de elevadas concentraciones de crioprotectores penetrantes y elevadas velocidades de enfriamiento, lo que permite el incremento de la viscosidad de la solución hasta conseguir un estado sólido sin la formación de hielo. Sin embargo, existen muy pocos datos de vitrificación de embriones de los camélidos sudamericanos.

Lattanzi y col (2002) analizaron la respuesta de los embriones de llama a dos métodos de criopreservación: vitrificación y congelación lenta. En el primero de los métodos los blastocistos eclosionados fueron expuestos a un medio de equilibrado (TCM 199, 15% etilenglicol, 20% de FCS y 50 µg/ml de gentamicina) a temperatura ambiente y posteriormente al medio de vitrificación (TCM 199, 30% de etilenglicol, + 20% de FCS + 1M de sacarosa), finalmente fueron introducidos en capilares de vidrio de 20 µl y sumergidos en nitrógeno líquido en menos de 1 min. El método de congelación lenta se llevó a cabo mediante la exposición de los embriones a una solución que contenía 1,5 M de etilenglicol y 20% de FCS, se introdujeron en pajuelas de 0,25 cc y fueron congelados de acuerdo al procedimiento convencional. La viabilidad de los embriones se determinó mediante el cultivo durante 48 h en SOFaa + BSA. Los porcentajes de supervivencia fueron similares para ambos procedimientos, siendo las tasas de reexpansión para los vitrificados y los congelados de 54% y 57% respectivamente.

Recientemente se ha intentado la vitrificación de embriones de llama utilizando el método OPS (von Baer y col, 2002). Los embriones fueron expuestos en una etapa o en dos etapas a la solución de vitrificación utilizando etilenglicol como crioprotector y posteriormente sumergidos en nitrógeno líquido. Tras el recalentamiento de los embriones y su posterior cultivo no se observaron diferencias en el porcentaje de reexpansión en función del método utilizado. Tampoco existían claras diferencias morfológicas entre los embriones morfológicas entre los embriones vitrificados y los no vitrificados, Sin embargo, no se consiguieron gestaciones. La baja supervivencia a la criopreservación ha sido atribuida al elevado contenido en lípidos de los embriones de estas especies (Brogliatti y col, 2000; von Baer y col, 2002), que los hacen muy diferentes de los de otras especies domésticas.

En un trabajo realizado por Aller y col (2002b) se vitrificaron embriones de llama y posteriormente fueron transferidos a hembras receptoras. Se realizó la transferencia de un total de 8 embriones vitrificados y 12 embriones frescos a 10 llamas (2 embriones a cada hembra). Las tasas de gestación logradas fueron del 50% (2/4) para los embriones vitrificados y 33,3% (2/6) para los frescos, sin que en ningún caso se produjera una gestación gemelar. Estos resultados demuestran que la vitrificación puede ser un método útil para la criopreservación de embriones de los camélidos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo general

Contribuir en el desarrollo de la transferencia de embriones en alpacas para poder aplicarla como una herramienta en los programas de mejora genética y en la recuperación de las distintas variedades y tonalidades de color de esta especie.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la respuesta ovárica a los tratamientos con hormona folículo estimulante (FSH) y con Gonadotropina Coriónica equina (eCG) administrados durante una fase luteal natural, en presencia de lactación y en ausencia de la misma.

Evaluar la influencia de la respuesta ovárica sobre el porcentaje de recuperación de embriones y las características de los mismo, aplicando un método de recogida no quirúrgico y realizando el lavado uterino a los 7 días de la copula.

Determinar el porcentaje de gestaciones logrado mediante la transferencia de embriones producidos a hembras receptoras de la misma especie.

Evaluar los efectos de la estimulación ovárica y el lavado del útero sobre la posterior eficiencia reproductiva de hembras utilizadas como donantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Área en que se realizó el estudio

El trabajo se realizó en el año 2007 entre los meses de enero y marzo (estación de lluvias) en las instalaciones del Centro de Investigación y Producción Quimsachata – Estación Experimental ILLPA Puno – Instituto Nacional de Investigación Agraria – Perú, situado a 4.200 msnm, en la Provincia de Lampa y distrito de Santa Lucía, departamento de Puno (Perú).

4.2. Animales

Donantes

Hemos seleccionado un total de 45 hembras con un rango de edades comprendido entre los 3 y 6 años en base a sus antecedentes de fertilidad, una parte de las mismas tuvieron una cría durante la campaña anterior (hembras no lactantes) y otra parte habían parido en la presente campaña (hembras lactantes). En estas últimas se respetó un periodo mínimo de descanso postparto de 15 días. Así, los dos grupos de animales quedaron constituidos por 13 hembras no lactantes y 32 lactantes. Todos los animales fueron evaluados mediante ecografía utilizando un equipo ALOKA SSD 500 Modo B, equipado con dos transductores lineales rectales, uno de 5 y otro de 7,5 MHz. La exploración ecográfica de los animales nos permitió comprobar la existencia de actividad ovárica y descartar la presencia de anomalías en su tracto reproductivo. Otro criterio utilizado para seleccionar los animales fue la posibilidad de introducir la mano del operador por vía rectal con posibilidades de manipular el tracto genital con comodidad.

Las hembras seleccionadas fueron alimentadas con pastos naturales en zonas aledañas al Centro Experimental y recibieron un suplemento alimenticio a base de heno de avena. Todas ellas presentaban una condición corporal entre 3 y 4 considerando una escala de 0 a 5.

Para provocar una fase luteal inducida previa a la superovulación, los animales se agruparon en base a la presencia de folículos en crecimiento con un diámetro igual o superior a los 7 mm y éstos fueron tratados con 4 µg de buserelina (Conceptal, Intervet internacional Boxmer, Holanda), con la finalidad de inducir la ovulación y la posterior formación de un cuerpo lúteo funcional.

Receptoras

El número de hembras seleccionadas como receptoras fue de 40 y su edad estaba comprendida entre 4 y 8 años. Todos los animales habían tenido como mínimo un descanso posparto de 15 días. Además, se comprobó que las dimensiones de su recto permitieran el paso de la mano para manipular el útero con relativa facilidad.

Todos los animales presentaban actividad ovárica y su condición corporal estaba comprendida entre 3 y 4. Las condiciones de alimentación y manejo fueron similares a las descritas previamente para las hembras donantes.

4.3. Tratamientos de superovulación

Las hembras lactantes y no lactantes fueron divididas al azar en dos grupos (Tabla 1) y cada uno de ellos sometidos a diferentes tratamientos hormonales siguiendo los protocolos descritos en el Esquema 1.

Grupo	Hormona		
	n	FSH	ECG
No lactantes	13	5	8
Lactantes	32	17	15
Total	45	22	23

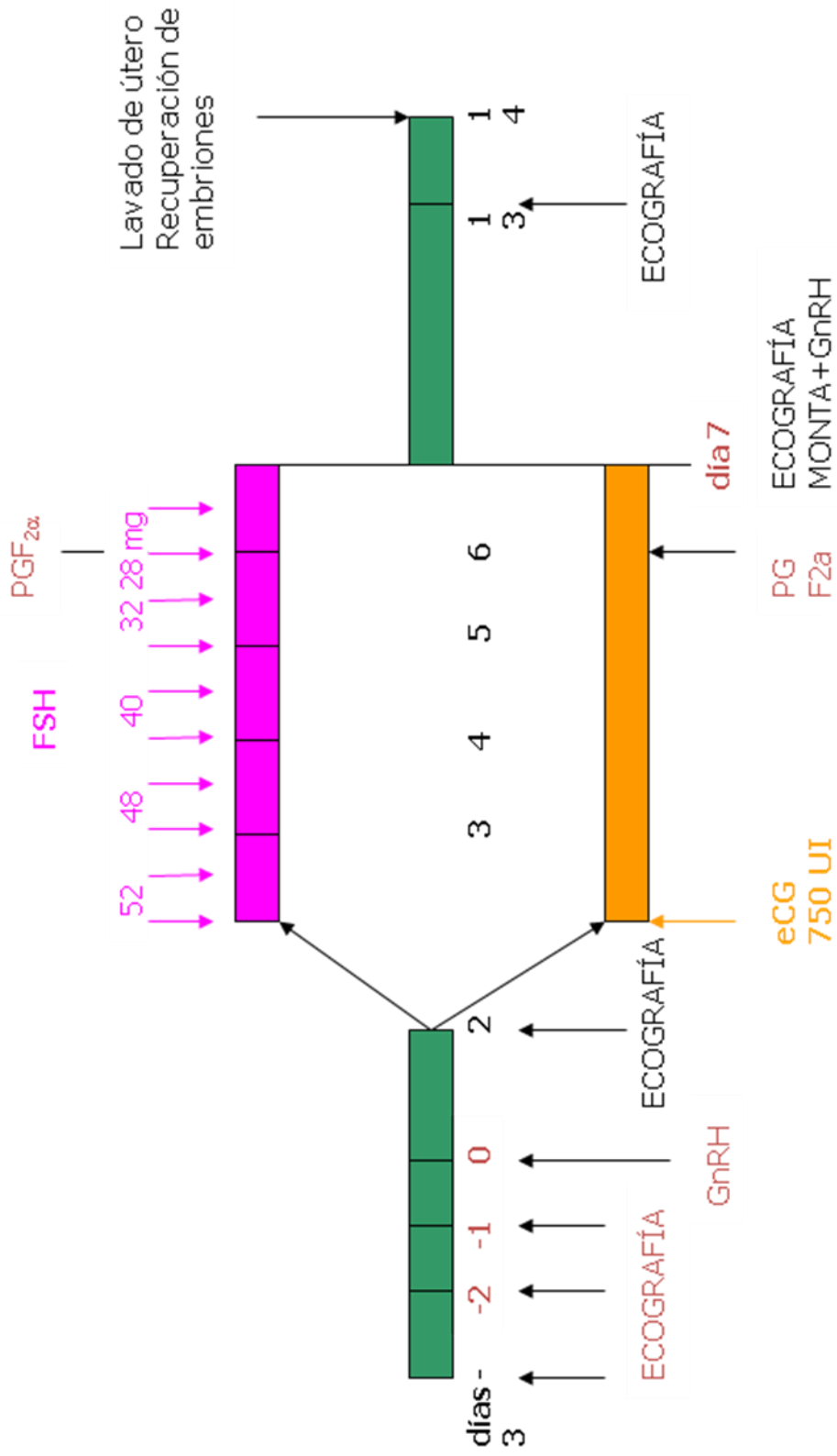
Tabla 1. Distribución de las hembras donantes en función de su situación fisiológica y la hormona utilizada para el tratamiento.

Las hormonas utilizadas en los diferentes tratamientos fueron las siguientes:

FSH (Folltropin V, Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario –Canadá), que fue administrada por vía intramuscular profunda en dosis decreciente (52, 48, 40, 32, 28 mg NIH) a intervalos de 12 horas durante 5 días hasta alcanzar una dosis total de 200 mg por animal.

Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) (Folligon, Intervet internacional, Holanda), administrada por vía intramuscular profunda en una dosis única de 750 UI por animal.

Acetato de buserelina (Conceptal, Intervet internacional, Holanda) se administraron 4 µg por animal.



Esquema 1. Protocolos de tratamiento hormonal utilizados en los diferentes experimentos

Como prostanoides se utilizó Tiaprost (Illeren, Intervet internacional, Alemania), inyectando 0,15 mg por animal.

Independientemente de la hormona utilizada, antes de iniciar los tratamientos se realizó la exploración ecográfica del ovario durante tres días consecutivos, con la finalidad de verificar la presencia de folículos en crecimiento con un diámetro superior a los 7 mm. Los animales que cumplían dicha condición recibieron 4 µg de buserelina para inducir la ovulación y fueron explorados 2 días más tarde para verificar la ovulación del folículo dominante, en cuyo caso se inició el tratamiento con las correspondientes hormonas (FSH o eCG) de acuerdo con la pauta de administración descrita en el Esquema 1.

Al cabo de 7 días del inicio del tratamiento experimental se realizó una nueva evaluación ecográfica del ovario para cuantificar el número y características de las estructuras presentes en el mismo (folículos y cuerpos lúteos) y posteriormente se realizaron montas controladas junto con la administración de 4 µg de buserelina para inducir la ovulación de los folículos que crecieron en respuesta a los tratamientos.

Seis días más tarde se evaluó nuevamente la situación ovárica al objeto de determinar el número y las características de las estructuras presentes en el mismo.

Todos los datos recogidos durante este proceso fueron anotados en una ficha individual para cada una de las hembras donantes.

4.4. Recuperación de los embriones

La recuperación de los embriones se realizó por un procedimiento no quirúrgico a los 7 días de efectuarse la monta en todas las hembras que presentaban 2 ó más cuerpos lúteos en sus ovarios. Antes de iniciar la operación se administró a cada animal 0,3 g de acepromacina (Promazil, Laboratorios Sanivet) para su tranquilización, se inmovilizó el animal en una manga de sujeción diseñada a tal efecto, se procedió a la eliminación del contenido rectal y se aplicaron 3 ml de clorhidrato de lidocaina al 2% (Lidocaina, Laboratorios Over) para conseguir la anestesia epidural caudal. Finalmente se realizó la limpieza y desinfección de la región perineal.

Cada uno de los cuernos uterinos fue lavado por separado mediante un catéter de Foley de 18 mm de diámetro, al ser el que mejor se adaptaba a las dimensiones del tracto genital de la alpaca. Para facilitar la introducción del catéter a través del cérvix

nos ayudamos de un fiador, que fue retirado parcialmente una vez alcanzado el correspondiente cuerno uterino. Una vez situado el catéter en el tercio anterior de uno de los cuernos se procedió al inflado del balón con 15 ml de aire y finalmente se retiró el fiador.

El lavado se realizó con PBS de Dulbecco (Sigma Aldrich, USA) suplementado con un 1% de Albúmina Sérica Bovina (BSA fracción V, Sigma Aldrich, USA), previamente calentado a una temperatura de 37° C.

Cada uno de los cuernos fue lavado con 200 ml de medio inyectando cantidades variables con una jeringa de 50 ml. El medio de lavado fue filtrado a través de un filtro EmCon con un diámetro de poro de 70 µm (EmCon, USA), para reducir su volumen hasta 20-30 cc y observado a 40X a través de un estereoscopio Nikon para proceder a la búsqueda de los embriones.

Una vez concluido el lavado de uno de los cuernos se repitió el mismo procedimiento en el otro cuerno.

Los embriones recuperados fueron transferidos al medio de manejo (PBS+3% de BSA) mantenido a una temperatura de 37 °C. Todos los embriones recuperados fueron evaluados y clasificados de acuerdo con los establecidos por la IETS (1998), estableciéndose las siguientes categorías:

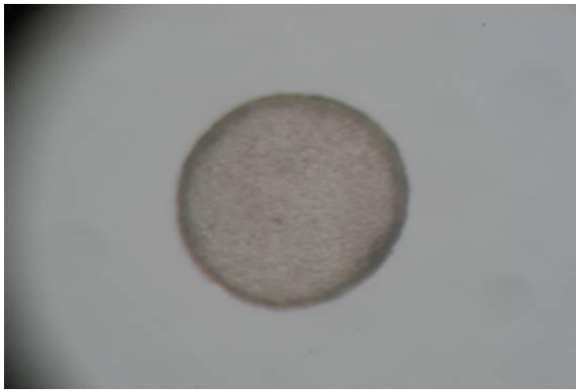
1. Embriones Excelentes. Se encuentran en uno de los estados de desarrollo esperados (blastocisto o blastocisto eclosionado), no muestran anomalías morfológicas aparentes, son esféricos y simétricos y sus células son uniformes en cuanto a color, tamaño y textura.

2. Embriones Buenos y Regulares. Se encuentran en uno de los estados de desarrollo esperados, presentan muy pocos defectos morfológicos como algún blastómero expulsado de la masa principal, forma ligeramente irregular o contienen alguna vesícula.

3. Embriones Malos: Se encuentran en uno de los estados de desarrollo esperado pero presentan defectos importantes, aunque no sean determinantes para su viabilidad posterior. Incluye aquellos embriones con numerosos blastómeros separados de la masa celular principal, presencia de núcleos picnóticos, etc, pero siempre con una masa celular aparentemente viable.

4. Embriones Degenerados y Retardados: Embriones con amplia degeneración celular y/o con un estado de desarrollo seriamente retardado, sin presentar una masa principal viable.

Criterios utilizados para determinar la calidad de los embriones



Excelentes



Buenos



Regulares



Malos

Apoyándonos en esta clasificación y con el fin de simplificar la interpretación de los resultados, se ha utilizado la siguiente terminología:

- Embriones totales: En esta categoría hemos incluido todas las estructuras recogidas.
- Mórulas

- Blastocistos excelentes: Incluye aquellos blastocistos eclosionados que mostraban unos bordes bien delimitados y no presentaban defectos morfológicos.
- Blastocistos Buenos: Incluye aquellos blastocistos eclosionados que presentan bordes con ligeras irregularidades, que no son muy manifiestas
- Blastocistos Regulares: Incluye aquellos blastocistos eclosionados cuyos bordes eran irregulares y aparecían arrugados.
- Blastocistos degenerados: Incluye aquellos blastocistos eclosionados con bordes muy irregulares y que contenían células picnóticas.

Finalmente se procedió a determinar las dimensiones de los embriones utilizando un ocular calibrado en μm .

4.5. Transferencia de embriones.

Hemos utilizado como receptoras alpacas adultas, cuyas características han sido previamente descritas. El ciclo ovárico de estas hembras fue sincronizado con el de las donantes mediante la administración de un análogo de la GnRH (buserelina) para sincronizar su ovulación con la de las donantes.

Los embriones seleccionados para su transferencia fueron lavados en tres ocasiones con PBS suplementado con un 10% de BSA a 37° C. A cada una de las receptoras se le transfirió un embrión utilizando un método no quirúrgico empleando un catéter de transferencia diseñado para la especie bovina (All stainless steel, 19250 Minitub, Alemania). Todas las transferencias se realizaron en el tercio anterior del cuerno uterino izquierdo, independientemente de la localización del cuerpo lúteo.

A los 20 días de la transferencia se realizó el diagnóstico de gestación mediante el empleo de ecografía trasrectal, considerando como signo de gestación la presencia de una vesícula embrionaria.

4.6. Evaluación de la fertilidad de las hembras donantes.

Las hembras utilizadas como donantes fueron sometidas a seguimiento ecográfico a intervalos semanales durante un periodo de 30 días, al objeto de evaluar su actividad

ovárica. Durante estas intervenciones se determinó el número de folículos presentes en cada ovario y las características de los mismos.

Al concluir este periodo fueron sometidas a montas controladas y 20 días más tarde se procedió al diagnóstico de gestación mediante ecografía transrectal.

4.7. Registro de información.

Toda la información recogida en cada una de las etapas del trabajo experimental fue anotada en una ficha individual para cada uno de los animales. Los datos recogidos fueron número y dimensiones de las estructuras presentes en el ovario en cada una de las exploraciones ecográficas, número de embriones totales obtenidos, número de embriones correspondientes a cada una de las categorías establecidas y dimensiones de los mismos.

En el caso de las receptoras se recogieron los resultados correspondientes al diagnóstico de gestación.

4.8. Análisis estadístico.

La influencia de los diferentes tratamientos hormonales y de la situación fisiológica de los animales en la respuesta ovárica (número de folículos correspondientes a cada categoría, número de cuerpos lúteos, dimensiones de las diferentes estructuras, etc) fueron evaluados mediante el Análisis de la varianza (ANOVA) en el caso de los valores paramétricos y mediante la Chi cuadrado en el caso de los porcentuales, utilizando para ello el programa SPSS (SPSS Inc. Chicago, USA). Los valores que se muestran en las diferentes tablas aparecen expresados como medias \pm error estándar y se considero que las diferencias observadas eran estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

1.- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA OVÁRICA A LOS TRATAMIENTOS CON HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) Y GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG), ADMINISTRADOS EN UNA FASE LUTEAL NATURAL, DURANTE LA LACTACIÓN Y EN AUSENCIA DE LA MISMA.

EXPERIMENTO 1.1: Respuesta ovárica al tratamiento con FSH y (eCG) en hembras lactantes y no lactantes.

El número medio de folículos preovulatorios, considerados como tales los que mostraban un diámetro comprendido entre 7 y 13 mm, observados en las hembras sometidas al tratamiento de estimulación ovárica fue de $8,98 \pm 6,84$, con un rango comprendido entre 0 a 27 folículos, de acuerdo con la distribución reflejada en el Gráfico 1. Como se puede apreciar en el mismo, solamente hubo una hembra que no mostraba ningún folículo perteneciente a esta categoría y otra que únicamente presentaba un folículo. Por otra parte, en dos de las hembras tratadas se observaron 27 folículos preovulatorios. Estos cuatro animales fueron excluidos del análisis posterior, las dos primeras al considerar que no habían respondido al tratamiento y las dos últimas por la posibilidad de que se hubieran producido errores de apreciación durante el recuento ecográfico.

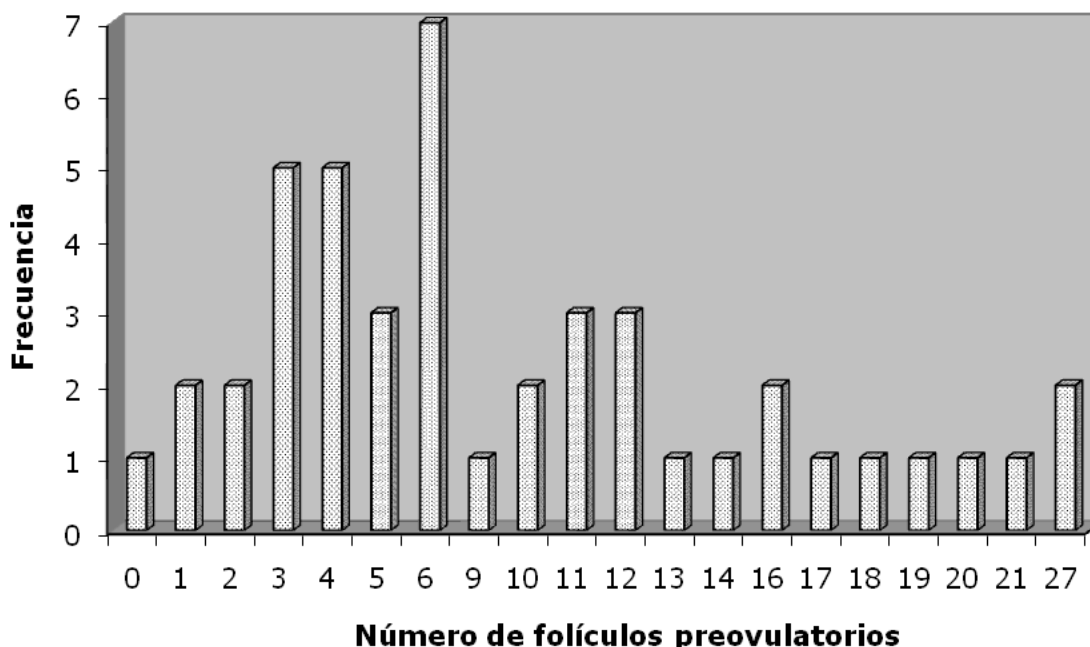


Gráfico 1: Distribución de los porcentajes de folículos con un diámetro comprendido entre 7 y 13 mm en la totalidad de las hembras utilizadas en el estudio.

Tras la eliminación de los animales anteriormente indicados, el valor medio obtenido para el número de folículos preovulatorios fue de $8,54 \pm 5,54$ (rango de 2 a 21).

La exploración ecográfica del ovario nos permitió comprobar que el 56,1 % de los animales (23/41) presentaba un cuerpo lúteo a los 7 días del inicio del experimento, mientras que en el 43,9% (18/41) se había completado ya la luteolisis como respuesta a las prostaglandinas administradas. Sin embargo, al comparar la respuesta ovárica de ambos grupos de animales se pudo comprobar que era bastante similar, no existiendo diferencias estadísticamente significativas.

Cuerpo lúteo	n	Nº Fol < 7 mm	Nº Fol de 7 a 13 mm	Nº Fol >13mm
Presente	23	4,78±0,79	8,82±1,17	0,73±0,31
Ausente	18	4,33±0,89	8,16±1,32	0,66±0,35

Tabla 2: Respuesta ovárica en los animales en función de la presencia o ausencia de cuerpo lúteo (medias estimadas \pm error estándar).

Al analizar los datos mediante Chi cuadrado ($p > 0,05$) pudimos comprobar que ni la condición de los animales (lactantes, no lactantes), ni la hormona utilizada (FSH, eCG) mostraban una influencia estadísticamente significativa sobre la presencia o ausencia de cuerpo lúteo a los 7 días del inicio del tratamiento experimental.

Los valores obtenidos al evaluar la respuesta ovárica de los animales aparecen recogidos en la Tabla 3. El análisis de los mismos nos permitió comprobar que únicamente la hormona utilizada tenía un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$), sin apreciarse ningún efecto de la condición o de la interacción hormona*condición.

Condición	Hormona	n	Nº Fol < 7 mm	Nº Fol de 7 a 13 mm	Nº Fol >13mm
Lactantes	eCG	13	3,92±1,01 ^a	9,76±1,51 ^a	1,53±0,40
	FSH	17	5,65±0,89 ^b	8,35±1,32 ^b	0,29±0,34
	Total	30	4,78±0,67	9,06±1,00	0,91±0,26
No lactantes	eCG	7	2,42±1,38 ^a	9,71±2,06 ^a	0,42±0,54
	FSH	4	6,00±1,83 ^b	3,25±2,72 ^b	0,25±0,72
	Total	11	4,21±1,15	6,48±1,71	0,33±0,45
Total	eCG	20	3,17±0,86 ^a	9,74±1,27 ^a	0,98±0,33
	FSH	21	5,82±1,02 ^b	5,80±1,51 ^b	0,27±0,40

^{a, b}. La presencia de diferentes letras en la misma columna indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3: Respuesta ovárica de los animales en base al número de estructuras presentes en el ovario (medias estimadas \pm error estándar).

Las hembras tratadas con FSH presentaron un mayor número de folículos pequeños y un menor número de folículos preovulatorios que las tratadas con eCG. Sin embargo, en estas últimas se observó un mayor número de folículos quísticos (> de 13 mm), especialmente acusado en el grupo de hembras lactantes, aunque las diferencias observadas entre grupos y tratamientos carecían de significación estadística.

Las características morfométricas de las estructuras presentes en los ovarios a los 7 días del comienzo del tratamiento experimental se describen de forma detallada en la Tabla 4. En ella se puede apreciar las poblaciones consideradas eran bastante homogéneas, al realizar el ANOVA únicamente se observó una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del producto hormonal utilizado sobre el diámetro de los folículos de 7 a 13 mm, obteniéndose unos valores medios ligeramente inferiores en las hembras tratadas con FSH.

Condición	Hormona	n	Fol < 7mm	n	Fol de 7 a 13 mm	n	Fol >13mm	n	Cuerpos Lúteos
Lactantes	eCG	60	5,43±0,14	181	9,27±0,25 ^a	20	15,17±0,51	10	10,80±0,65
	FSH	96	5,47±0,12	142	8,40±0,22 ^b	5	14,50±0,96	10	11,00±0,54
	Total	156	5,45±0,09	323	8,83±0,16	25	14,83±0,54	20	10,94±0,42
No lactantes	eCG	23	5,51±0,19	68	8,76±0,34 ^a	3	14,00±0,78	5	10,40±0,77
	FSH	35	5,15±0,24	13	8,23±0,45 ^b	2	15,75±0,96	2	8,00±1,72
	Total	58	5,33±0,15	81	8,49±0,28	5	14,87±0,62	7	9,20±0,94
Total	eCG	83	5,47±0,12	249	9,01±0,21 ^a	23	14,58±0,47	15	10,60±0,50
	FSH	131	5,31±0,13	155	8,31±0,25 ^b	7	15,12±0,68	12	9,50±0,90

^{a, b}. La presencia de diferentes letras en la misma columna indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 4: Diámetro de las diferentes estructuras observadas en el ovario a los 7 días del inicio del experimento (medias estimadas ± error estándar).

A pesar de que como hemos señalado anteriormente, el cuerpo lúteo no parecía influir de manera significativa en la respuesta ovárica, en ausencia de CL el comportamiento de las hembras era diferente en función de la hormona utilizada, pudiendo comprobar que las mejores respuestas ováricas se producían en las hembras lactantes, si bien estos animales eran también más propensos a desarrollar folículos quísticos, especialmente cuando eran tratados con eCG (Tabla 5). No obstante, las diferencias observadas carecían de significación estadística.

Condición	Hormona	n	Nº Fol < 7 mm	Nº Fol de 7 a 13 mm	Fol >13mm
Lactantes	eCG	6	3,00±1,51	10,50±2,32	1,50±0,62
	FSH	7	6,29±1,40	8,43±2,15	0,14±0,57
	Total	13	4,64±1,03	9,46±1,58	0,82±0,42
No lactantes	eCG	2	1,00±2,63	4,67±3,69	0,50±1,07
	FSH	3	4,67±1,40	3,67±3,69	0,33±0,88
	Total	5	2,83±1,69	5,33±2,60	0,41±0,69
Total	eCG	9	2,00±1,51	8,70±2,32	1,00±0,62
	FSH	10	5,47±1,28	6,04±1,96	0,23±0,52

Tabla 5: Respuesta de los animales considerando el número de estructuras presentes en el ovario en las hembras que no presentaban cuerpo lúteo (medias estimadas ± error estándar).

En el 34,1 % de las hembras (14/41) aparecieron folículos quísticos, variando su número entre 1 y 7. La presencia de dichos folículos fue mayor en las hembras tratadas con eCG 10/14 (71,42%) y el análisis mediante Chi cuadrado nos permitió comprobar que la hormona utilizada (FSH frente a eCG) influía en la presencia de estas estructuras anormales ($p < 0,05$). No obstante, la presencia de los mismos no ejercía un efecto estadísticamente significativo sobre el posterior número de cuerpos lúteos presentes en el ovario en el momento de realizar el lavado del útero (Tabla 6), aunque los valores obtenidos para este parámetro fueron superiores en las hembras con quistes.

Folículos quísticos	Hormona	n	Nº CL < 7 mm	Nº CL de 7 a 13 mm
Presentes	eCG	10	2,70±1,16	11,30±1,71
	FSH	4	5,50±1,83	10,50±2,71
Ausentes	eCG	10	4,10±1,16	8,20±1,71
	FSH	17	5,76±0,89	6,64±1,31

Tabla 6: Respuesta ovárica en los animales en función de la presencia o ausencia de folículos quísticos (medias estimadas ± error estándar).

EXPERIMENTO 1.2: Influencia de la respuesta ovárica al tratamiento hormonal sobre la producción de embriones y calidad de los mismos.

La respuesta ovárica de las hembras que produjeron embriones y las que no los produjeron fue bastante similar, no existiendo diferencias estadísticamente significativas para las diferentes estructuras consideradas. Sin embargo, pudimos comprobar que en las hembras tratadas con FSH en las que no se recuperó ningún embrión, el número medio de folículos menores de 7 mm era notablemente superior. Por el contrario, en las hembras tratadas con eCG que no produjeron embriones los mayores valores se observaban en las categorías de 7 a 13 mm y > de 13 mm.

Embriones	Hormona	n	Nº Fol < 7 mm	Nº Fol de 7 a 13 mm	Nº Fol >13mm	Nº Cuerpos Lúteos
SI	eCG	11	3,81±0,97	7,81±1,53	0,36±0,22	0,63±0,15
	FSH	7	3,85±1,20	7,71±1,92	0,42±0,28	0,28±0,18
	Total	18	3,83±0,78	7,76±1,23	0,39±0,18	0,46±0,12
NO	eCG	6	1,33±1,31	10,16±2,08	0,83±0,30	0,66±0,20
	FSH	11	6,09±0,97	5,72±1,53	0,27±0,22	0,63±0,15
	Total	17	3,71±0,81	7,94±1,29	0,55±0,18	0,65±0,12

Tabla 7: Respuesta ovárica en los animales en función de la producción o no de embriones (medias estimadas ± error estándar).

En un análisis posterior tratamos de determinar la influencia de la respuesta ovárica en la producción de embriones viables, para lo cual consideramos solamente los animales que produjeron blastocistos. Sin embargo, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la ausencia de diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8). No obstante, como en el caso anterior las hembras tratadas con FSH que no produjeron blastocistos presentaron un mayor número de folículos < de 7 mm.

Blastocistos	Hormona	n	Nº Fol < 7 mm	Nº Fol de 7 a 13 mm	Nº Fol >13mm	Nº Cuerpos Lúteos
SI	eCG	9	4,44±1,07	8,44±1,66	0,33±0,46	0,66±0,17
	FSH	6	4,80±1,44	9,60±2,23	0,60±0,33	0,40±0,23
	Total	15	4,62±0,90	9,02±1,39	0,46±0,20	0,53±0,14
NO	eCG	14	1,25±1,14	5,30±1,38	0,75±0,26	0,62±0,18
	FSH	16	5,38±0,89	6,56±1,65	0,23±0,20	0,53±0,14
	Total	30	3,31±0,72	7,09±1,12	0,49±0,16	0,58±0,11

Tabla 8: Respuesta ovárica en los animales en función de la producción o no de blastocistos (medias estimadas ± error estándar).

El número medio de cuerpos lúteos presentes en el ovario en el momento de realizar el lavado del útero en las hembras sometidas al tratamiento de estimulación

ovárica fue de $7,73 \pm 4,44$ (rango de 0 a 18), con la distribución representada en el Gráfico 2. Como se puede apreciar en el mismo solamente hubo 2 hembras que no respondieron al tratamiento y 1 que tan solo presentó un cuerpo lúteo, lo que representa un porcentaje de respuesta del 93,18% (41/44). Estas hembras no fueron lavadas por lo que han sido excluidas del análisis posterior.

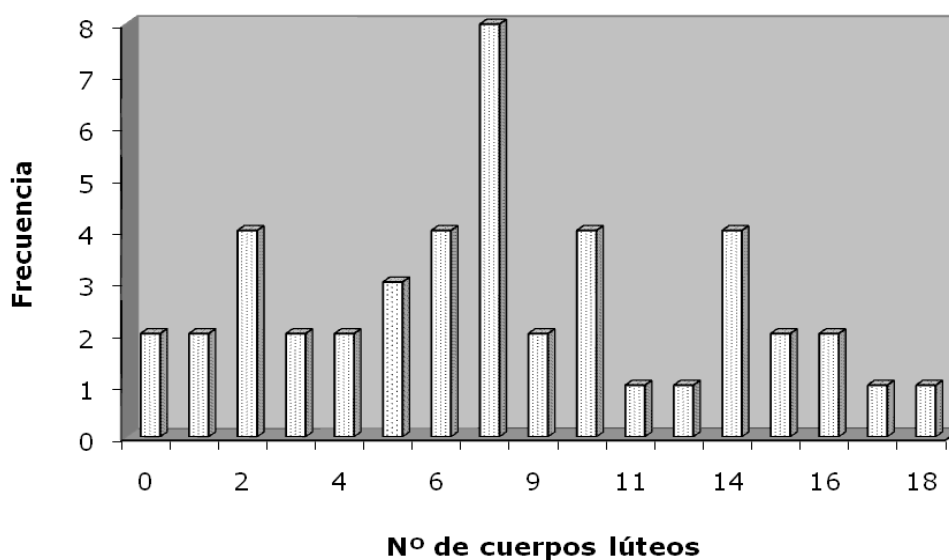


Gráfico 2: Distribución del número de cuerpos lúteos en las hembras tratadas

Al analizar el efecto de la condición de los animales, la hormona utilizada y la interacción de ambas, pudimos comprobar que únicamente la hormona empleada ejercía un efecto estadísticamente significativo sobre los valores obtenidos para el número de cuerpos lúteos. Así, los valores obtenidos para este parámetro fueron superiores en las hembras tratadas con eCG respecto a las que se administró FSH. Los valores obtenidos para las distintas variables aparecen reflejados en la Tabla 9.

Condición	Hormona	n	Nº Cuerpos Lúteos	Nº de Fol <7mm	Nº de Fol de 7 a 13 mm	Nº de Fol >13mm
Lactantes	eCG	13	$10,00 \pm 1,17^a$	$0,15 \pm 0,23$	$2,23 \pm 0,68$	$1,38 \pm 0,47$
	FSH	16	$6,43 \pm 1,06^b$	$0,56 \pm 0,20$	$2,62 \pm 0,61$	$0,68 \pm 0,42$
	Total	29	$8,21 \pm 0,79$	$2,42 \pm 0,45$	$0,35 \pm 0,15$	$1,03 \pm 0,31$
No lactantes	eCG	7	$9,85 \pm 1,60^a$	$0,14 \pm 0,31$	$2,00 \pm 0,92$	$1,00 \pm 0,64$
	FSH	3	$5,00 \pm 2,45^b$	$1,00 \pm 0,48$	$2,33 \pm 1,41$	$1,33 \pm 0,98$
	Total	10	$7,42 \pm 1,46$	$2,16 \pm 0,84$	$0,57 \pm 0,28$	$1,16 \pm 0,58$
Total	eCG	20	$9,92 \pm 0,99^a$	$0,14 \pm 0,19$	$2,47 \pm 0,77$	$1,19 \pm 0,39$
	FSH	19	$5,71 \pm 1,33^b$	$0,78 \pm 0,26$	$1,19 \pm 0,39$	$1,01 \pm 0,53$

^{a, b}. La presencia de diferentes letras en la misma columna indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$).

Tabla 9: Estructuras presentes en el ovario a los 6 días de la cópula (medias estimadas \pm error estándar).

Al calcular el porcentaje de ovulación, considerando solamente los folículos con un diámetro comprendido entre 7 y 13 mm observamos que en algunos animales los valores obtenidos superaban el 100%, lo que podría indicar que algunos de los folículos de diámetro inferior a 7 mm habrían sido capaces de ovular o de transformarse en cuerpos lúteos. Ello, nos llevó a realizar un nuevo cálculo considerando la totalidad de los folículos presentes en el ovario y en este caso obtuvimos un porcentaje de ovulación medio del 70,91%.

El número de folículos anovulatorios después de la monta osciló entre 0 y 7, sin que pudiéramos comprobar ninguna influencia de la condición de los animales o la hormona administrada en la presencia de los mismos. No obstante, es necesario resaltar que las dos hembras que presentaron 7 folículos anovulatorios eran animales lactantes que habían sido tratadas con eCG.

2.- EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA RESPUESTA OVÁRICA SOBRE EL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE EMBRIONES Y LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS MISMOS:

EXPERIMENTO 2.1: Evaluación de la recogida de embriones a los 7 días de la copula en función de la situación fisiológica de las hembras y de la hormona utilizada.

El lavado uterino se realizó en 34 de los 41 animales (82,92%), puesto que 2 de las hembras no presentaban ningún cuerpo lúteo y en 5 de los animales fue imposible realizar la cateterización cervical debido a la oclusión del mismo o a las reducidas dimensiones del recto. Solamente obtuvimos embriones en 18 de los animales (52,94%). La distribución porcentual de los animales en función del número de embriones obtenidos aparece recogida en el Gráfico 3. El porcentaje de recuperación obtenido en estas hembras, en base al recuento del número de cuerpos lúteos presentes en el ovario, fue del 41,1%.

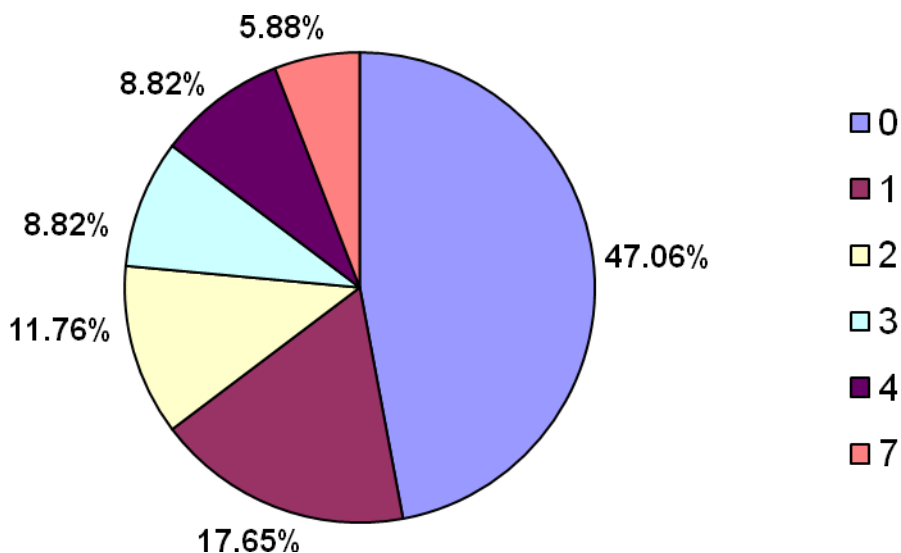


Gráfico 3. Distribución porcentual de los animales en función del número de embriones obtenidos

El número total de embriones obtenidos fue de 49, con un rango comprendido entre 0 y 7, de los cuales 36 fueron blastocistos eclosionados (73,46%) y 13 mórulas (26,53%). En la mayor parte de los animales se obtuvieron únicamente blastocistos, aunque algunas hembras produjeron mórulas y blastocisto y otras solamente mórulas (Gráfico 4).

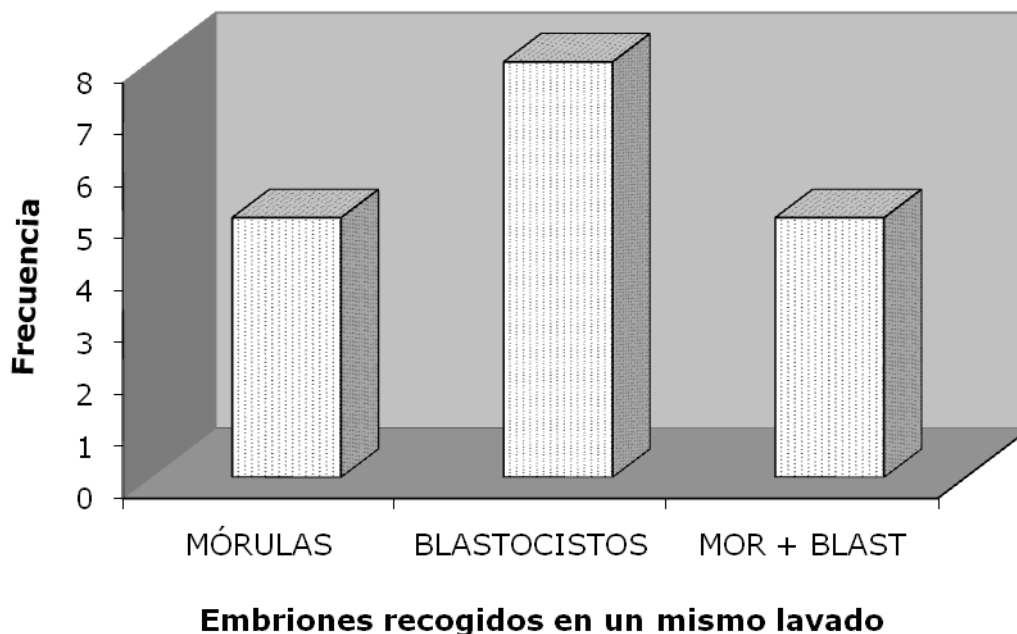


Gráfico 4: Número de animales en los que se obtuvieron embriones en las diferentes categorías de desarrollo.

El porcentaje de animales en los que no se obtuvo ningún embrión fue superior en el grupo de hembras tratado con FSH (70,58 frente a 52,94%). No obstante, los porcentajes de blastocistos obtenidos de hembras tratadas con FSH, 41,66% (15/36) y de las tratadas con eCG 58,33% (21/36), fueron muy similares. La existencia o no de lactación tampoco afectó a los resultados en cuanto a la producción de embriones, siendo muy similares los porcentajes de animales en los que no se obtuvo ningún embrión (66,6 frente a 50%).

Al analizar los resultados obtenidos pudimos comprobar que el mayor número de embriones totales y de blastocistos se logró al emplear FSH en las hembras lactantes y eCG en las no lactantes. Sin embargo, las diferencias observadas carecían de significación estadística (Tabla 10).

Condición	Hormona	n	Embriones totales	Blastocistos	Mórulas
Lactantes	eCG	7	1,71±0,47	1,00±0,50	0,71±0,24
	FSH	6	3,33±0,51	2,16±0,54	1,16±0,26
	Total	13	2,52±0,35	1,58±0,37	0,94±0,18
No lactantes	eCG	4	3,75±0,62	3,50±0,67	0,25±0,33
	FSH	1	2,00±	2,00±	0,00±
	Total	5	2,87±0,70	2,75±0,74	0,12±0,36
Total	eCG	11	2,73±0,39	2,25±0,42	0,48±0,20
	FSH	7	2,66±0,68	2,08±0,72	0,58±0,35

Tabla 10: Número de embriones recuperados a los 7 días de la cópula en función de la situación fisiológica de los animales y la hormona utilizada (medias estimadas ± error estándar).

La mayor parte de las mórulas obtenidas procedían del grupo de hembras lactantes (92,30%) (Gráfico 5) y en este caso el análisis estadístico mediante la Chi cuadrado demostró que la situación fisiológica de los animales ejercía un efecto altamente significativo ($p < 0,01$).

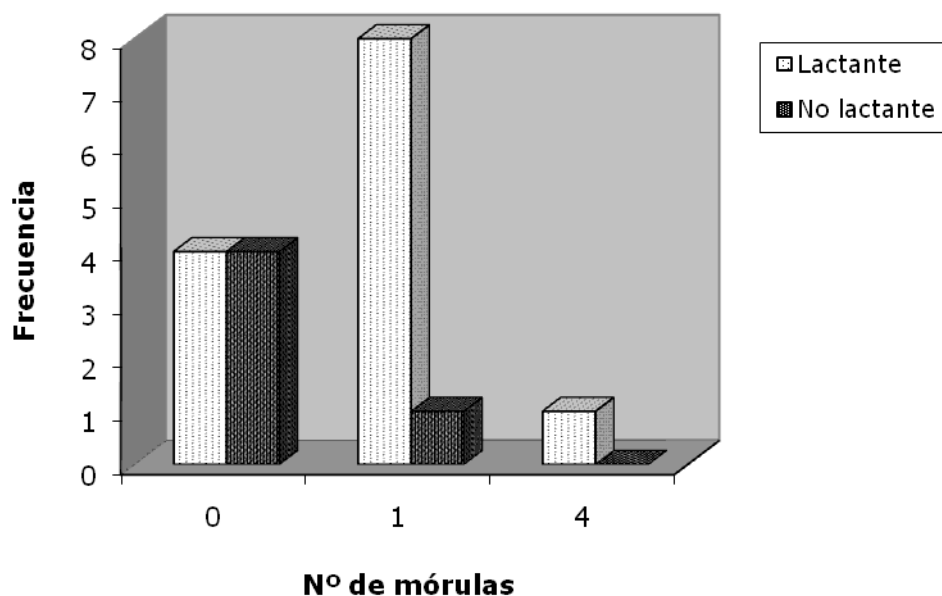


Gráfico 5. Influencia de la situación fisiológica de los animales en el número de mórulas obtenido

Sin embargo, la hormona utilizada afectaba al número de mórulas obtenida, de tal forma que el 46,15% de las mismas procedían de hembras tratadas con eCG y el 53,84% de las tratadas con FSH. No obstante, debemos destacar que el único animal que produjo 4 mórulas había sido tratado con esta última hormona.

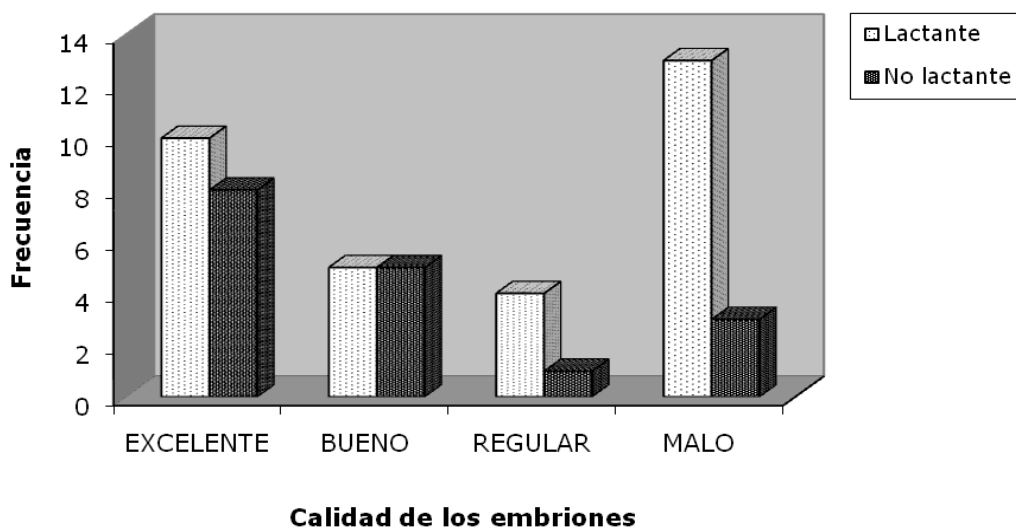
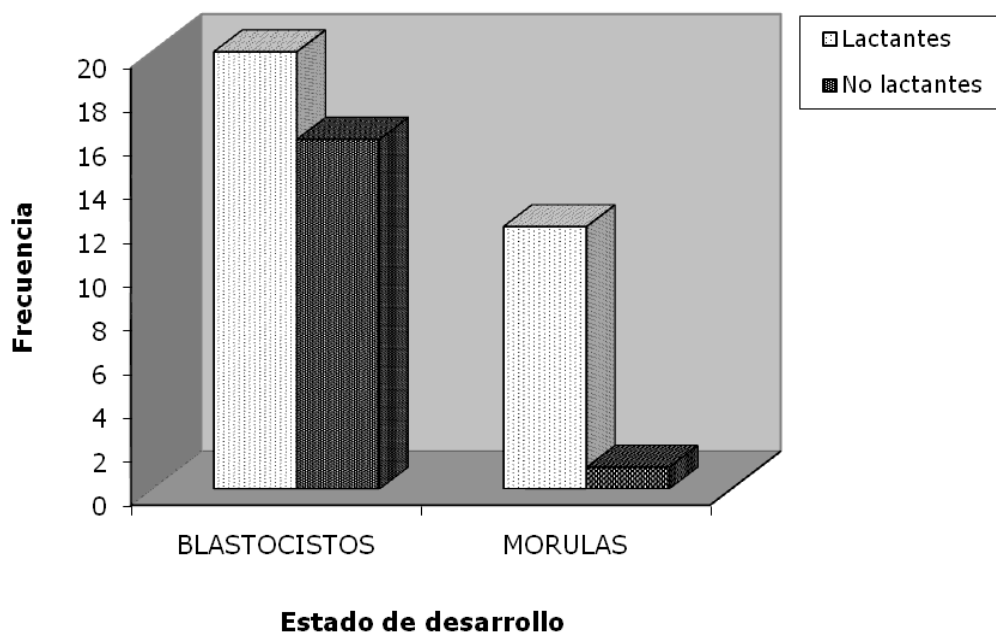


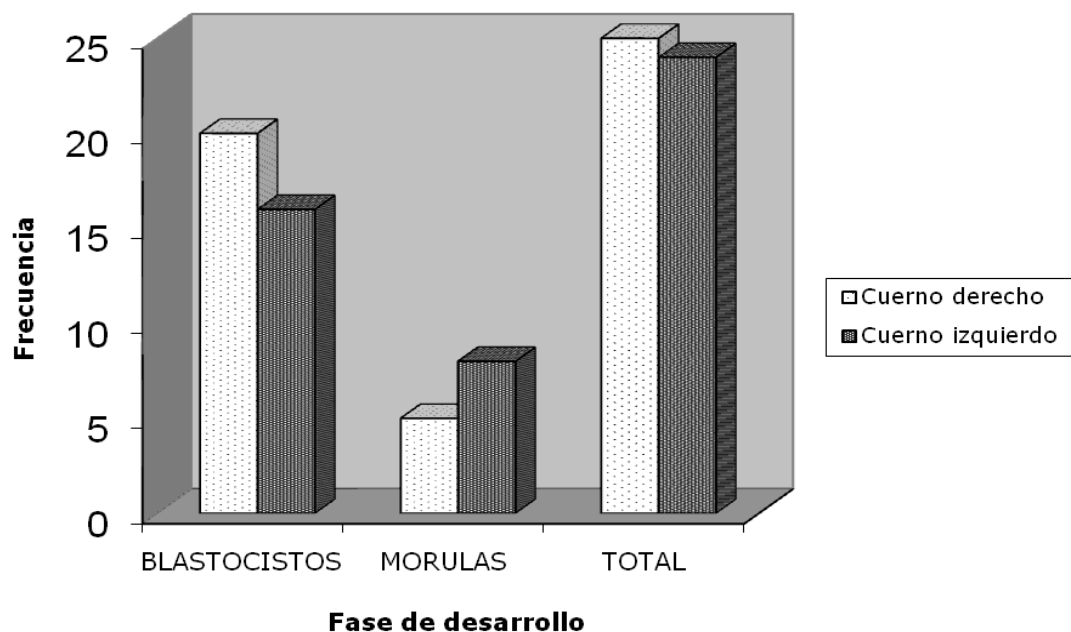
Gráfico 6: Efecto de la situación fisiológica de los animales en las características de los embriones producidos.

Al evaluar la calidad de embriones recuperados pudimos comprobar que la administración de FSH permitió obtener un mayor número de embriones catalogados como excelente (Tabla 11), mientras que el empleo de eCG permitió obtener un mayor número de embriones buenos, aunque las diferencias observadas carecían de significación estadística ($P < 0.05$). El número de embriones regulares y malos no presentó diferencias entre grupos.

Condición	Hormona	n	Excelentes	Buenos	Regulares	Malos
Lactantes	eCG	7	0,57±0,43	0,14±0,44	0,14±0,17	0,85±0,38
	FSH	6	1,00±0,47	0,66±0,47	0,50±0,19	1,16±0,41
	Total	13	0,78±0,32	0,40±0,32	0,32±0,13	1,01±0,28
No lactantes	eCG	4	1,50±0,57	1,25±0,58	0,25±0,23	0,75±0,50
	FSH	1	2,00±1,15	0,00±	0,00±	0,00±
	Total	5	1,75±0,64	0,62±0,65	0,12±0,26	0,37±0,56
Total	eCG	11	1,03±0,36	0,69±0,36	0,19±0,14	0,80±0,31
	FSH	7	1,50±0,62	0,33±0,62	0,25±0,25	0,58±0,54

Tabla 11: Calidad de embriones recuperados según condición de donadoras y hormonas (medias estimadas ± error estándar).

El Gráfico 7, indica que la distribución de los embriones obtenidos en cada uno de los cuernos uterinos (derecho e izquierdo) era bastante homogénea. Sin embargo, se obtuvo una mayor cantidad de blastocistos del cuerno derecho y un mayor número de morulas en el izquierdo. Además, la calidad de los embriones obtenidos del cuerno derecho parecía ser superior (Gráfica 8).



Gráfica 7: Distribución de los embriones en función de su grado de desarrollo y cuerno de procedencia.

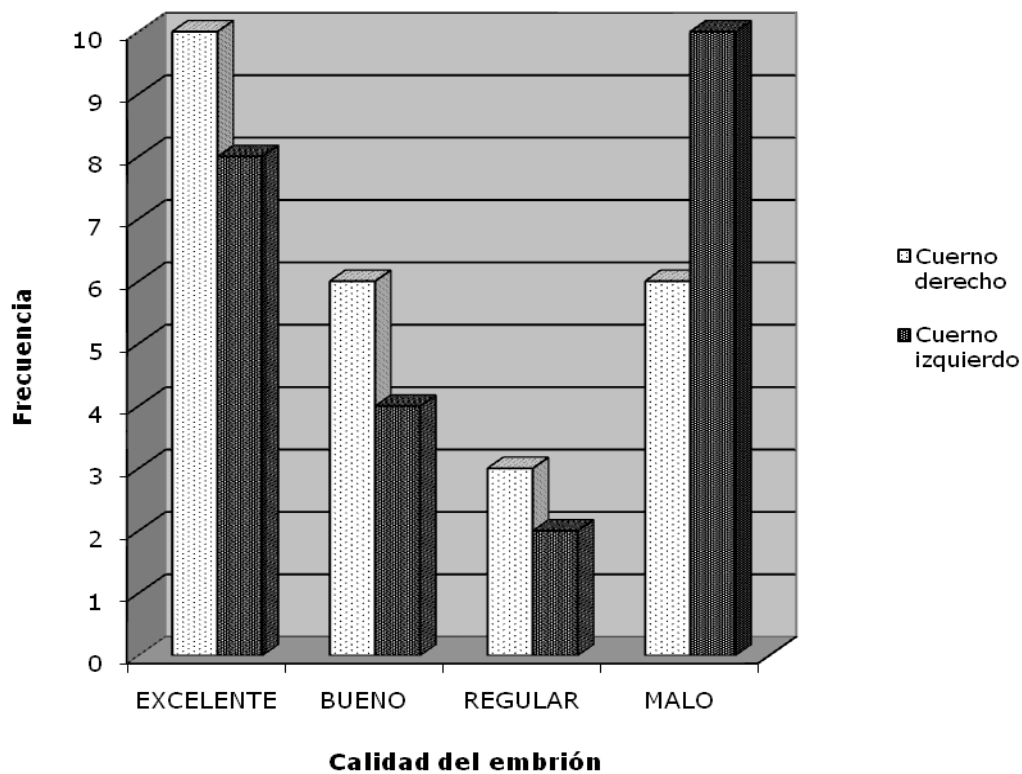


Gráfico 8: Distribución de los embriones en función de su calidad y del cuerno de procedencia

Finalmente evaluamos el efecto de la situación ovárica en el momento de la copula en la posterior producción de blastocistos. Así, pudimos comprobar que 22 de los 36 blastocistos obtenidos (61,11%) procedían de las hembras que presentaron un CL en el momento de cópula y tan solo 14 (38,88%) de las que no lo presentaban. Sin embargo, el porcentaje de animales en los que no se obtuvo ningún embrión fue similar para ambos grupos (64,28 frente a 60%). La distribución del número de embriones en ambos grupos aparece recogida en la Gráfica 9, en la que se puede constatar que todos los animales que produjeron 4, 6 ó 7 embriones en el mismo lavado se caracterizaban por presentar un cuerpo lúteo en el momento de la cópula.

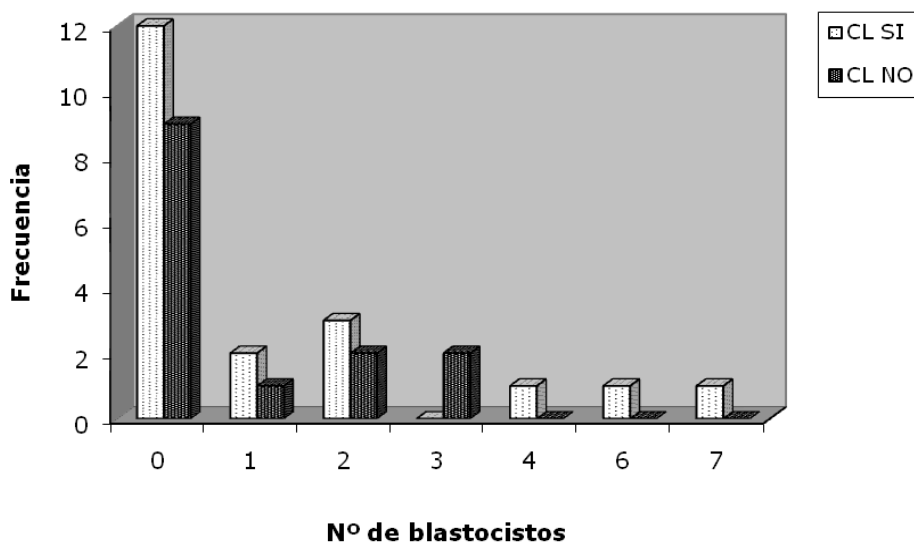


Gráfico 9: Distribución del número de blastocistos producidos en función de la presencia o ausencia de cuerpo lúteo al final del período de estimulación ovárica

La presencia o ausencia de un cuerpo lúteo en el momento de la cópula parecía influir también en el porcentaje de mórulas obtenido. Así, el 69,23% de las mórulas procedían de hembras que no presentaban CL y solamente el 30,76 % de las que lo presentaron. (Gráfica 10).

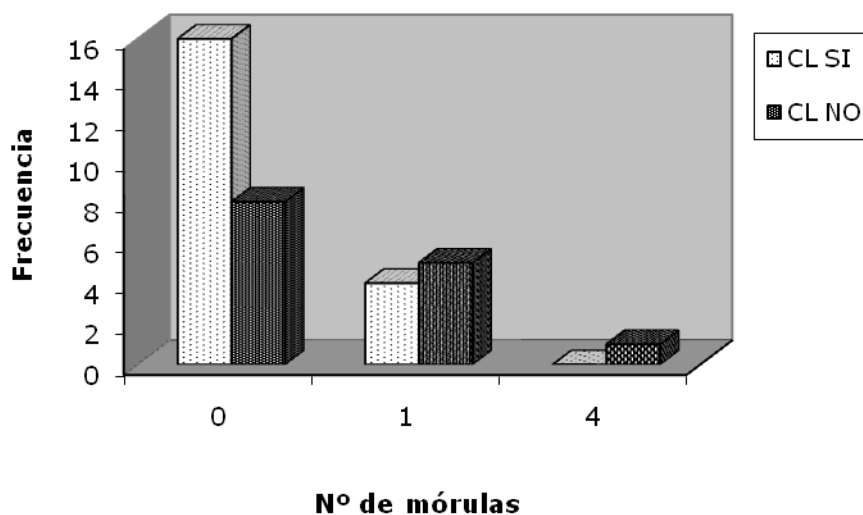


Gráfico 10: Influencia de la Presencia o ausencia de cuerpos lúteo en el momento de la cópula en el número de mórulas obtenidas.

La presencia de folículos anovulatorios no parecía afectar al número de embriones producidos ni a la calidad de los mismos. Sin embargo, debemos destacar que en la única hembra que presentaba tres folículos anovulatorios solamente produjo mórulas.

EXPERIMENTO 2.2: Evaluación de las características de los embriones obtenidos.

El diámetro medio de los blastocistos fue de 610 μm (rango de 200 a 1150 μm) y el de las mórulas de 200 μm (rango de 150 a 250 μm). Para realizar el análisis estadístico agrupamos a los blastocistos en 5 categorías en función de su diámetro: A (200 a 400 μm), B (401 a 600 μm), C (601 a 800 μm), D (801 a 1000 μm) y E (más de 1000 μm). La distribución de los blastocistos en base a estas categorías aparece reflejada en el Gráfico 11. En ella se puede comprobar que la más frecuente es la que agrupa a los blastocistos con un diámetro de 401 a 600 μm . Sin embargo, no fuimos capaces de establecer ninguna correlación entre el diámetro de los blastocistos y la calidad de los mismos.

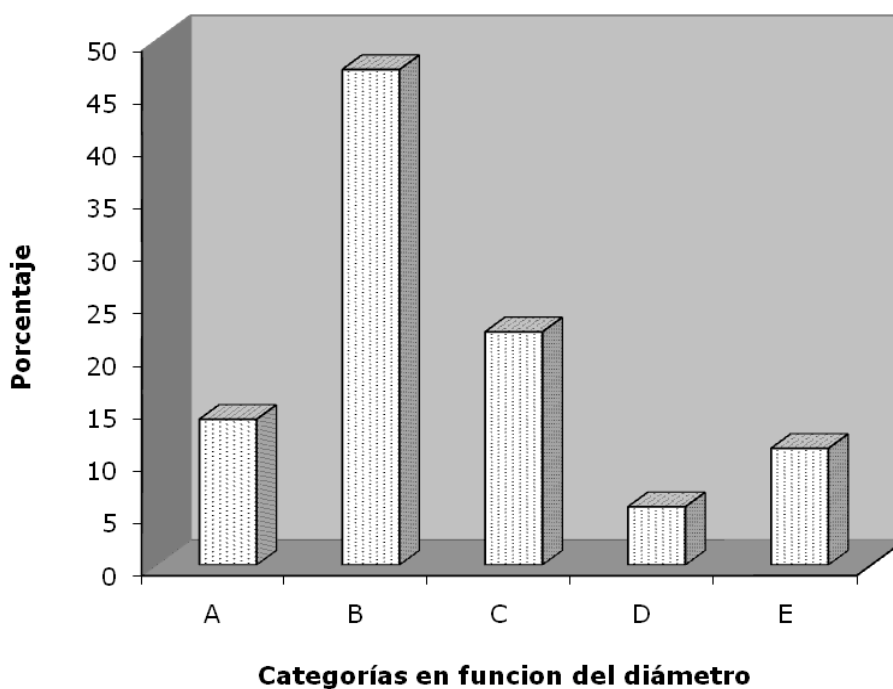


Gráfico 11: Distribución de blastocistos obtenidos en función de su diámetro: A(200 a 400 μm), b(401 a 600 μm), C(601 a 800 μm), D(801 a 1000 μm) y E(más de 100 μm).

Al analizar la influencia de los diferentes factores considerados (condición, hormona, localización del cuerpo lúteo y sus interacciones) sobre el diámetro de los blastocistos, pudimos comprobar que tanto la condición fisiológica de las hembras como la hormona empleada influían de manera significativa en el valor de este parámetro ($p < 0,05$). Por el contrario, la localización del cuerpo lúteo y las diferentes interacciones no ejercían un efecto estadísticamente significativo Tabla 12.

Condición	Hormona	n	Diámetro
Lactantes	eCG	7	0,51±0,06 ^a
	FSH	13	0,47±0,05 ^b
	Total	20	0,49±0,04 ^a
No lactantes	eCG	14	0,81±0,04 ^a
	FSH	2	0,56±0,12 ^b
	Total	16	0,68±0,06 ^b
Total	eCG	21	0,66±0,04 ^a
	FSH	15	0,51±0,06 ^b

^{a, b}. La presencia de diferentes letras de igual color en la misma columna indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 12: Influencia de los factores considerados sobre el diámetro de los blastocistos (medias estimadas \pm error estándar).

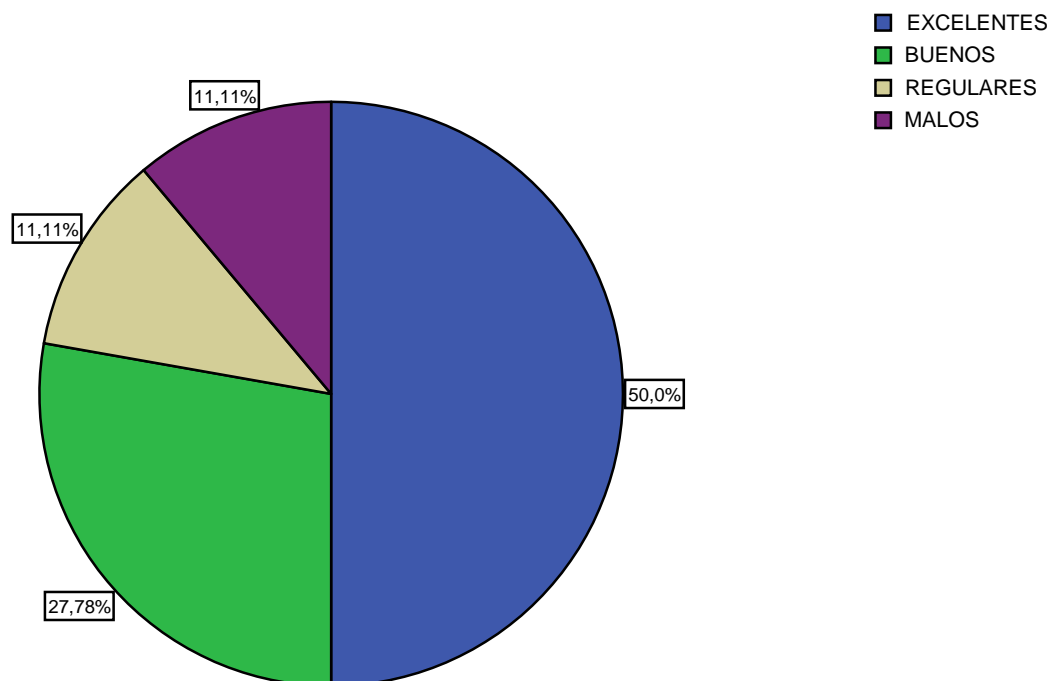


Gráfico 12: Distribución de los blastocistos obtenidos en los grupos considerados para determinar su calidad.

3.- EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE GESTACIÓN TRAS LA TRANSFERENCIA A HEMBRAS RECEPTORAS DE LA MISMA ESPECIE.

Hemos transferido un total de 32 embriones de calidades excelentes, buenas y regulares a igual número de hembras receptoras, consiguiendo un total de 14 gestaciones (43,75%) y estando En la actualidad pendiente de que se produzcan los partos. Los porcentajes de gestación logrados con cada una de las categorías establecidas fue el siguiente: 50% excelentes, 45,45% buenos y 0% regulares, lo que parece indicar que los criterios empleados en la evaluación de los embriones fueron adecuados.

La localización del cuerpo lúteo no influyó en los resultados de gestación, ya que los valores obtenidos fueron de 46,15% (6/13) cuando el cuerpo lúteo se localizaba en el ovario derecho y de 46,66 % (7/15) cuando estaba situado en el izquierdo. No obstante, en las hembras que presentaban dos cuerpos lúteos, uno en cada ovario, los porcentajes de gestación fueron muy bajos 25% (1/4).

Al eliminar del análisis los animales que presentaron dos cuerpos lúteos, pudimos comprobar que el 53,85% (7/13) de las gestaciones logradas correspondían a los animales cuyo cuerpo lúteo se situaba en el ovario izquierdo, mientras que solamente fue del 46,15% (6/13) cuando se localizaba en el derecho. Sin embargo, el efecto de la ubicación del cuerpo lúteo carecía de significación estadística.

Al evaluar la influencia del diámetro de los embriones sobre la gestación, pudimos comprobar que únicamente se lograron gestaciones cuando el diámetro de los embriones transferidos estaba comprendido entre 400 y 1000 μm .

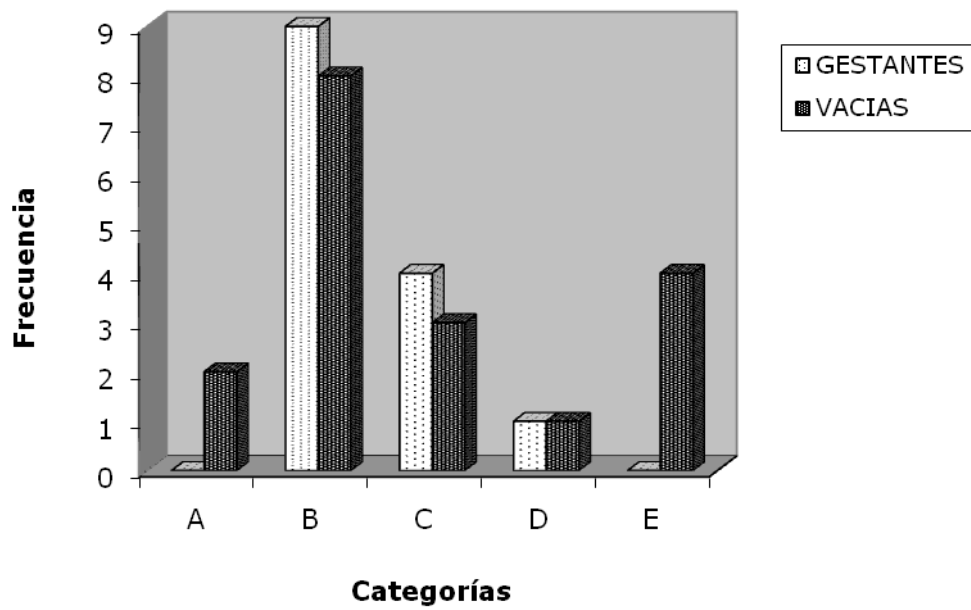


Gráfico 13: Influencia del diámetro de los embriones sobre las tasas de gestación: A (200 a 400 μm), B 401 a 600 μm), C (601 a 800 μm), D (801 a 1000 μm) y E (más de 1000 μm).

4.- EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA Y EL LAVADO DEL ÚTERO SOBRE LA POSTERIOR EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE HEMBRAS UTILIZADAS COMO DONANTES.

La evaluación ecográfica del ovario de las hembras donantes en los días 7, 14, 21 y 28 posteriores al lavado del útero nos permitió comprobar la evolución del órgano en cuanto a la presencia de folículos preovulatorios. Así, a los 7 días presentaban folículos preovulatorio el 50% de los animales, a los 14 días el 60%, a los 21 días la cifra descendía hasta el 30% y a los 28 días se elevaba hasta el 90% (Tabla 13).

	Días				Total
	7	14	21	28	
Folículos de NO 7 a 13	5	4	7	1	17
SI	5	6	3	9	23
Total	10	10	10	10	40

Tabla 13: Evaluación de la presencia de folículos preovulatorios en el ovario de las hembras donantes en diferentes etapas posteriores al lavado uterino.

La hormona utilizada para inducir la ovulación múltiple parecía influir en la posterior recuperación de la actividad ovárica, de tal forma que en las hembras tratadas con FSH el porcentaje de animales que presentaron folículos preovulatorios durante el periodo considerado fue superior al de las tratadas con eCG (58,82 frente a 30,43%).

		Hormona	
		eCG	FSH
Folículos preovulatorios	SI	7	10
	NO	16	7
Total		23	17

Tabla 14: Influencia de la hormona utilizada durante la superovulación en la presencia de folículos preovulatorios durante los 28 días posteriores al lavado del útero.

Tras el correspondiente periodo de descanso de 30 días, las hembras fueron sometidas a monta controlada y a diagnóstico de gestación 20 días más tarde. Los resultados obtenidos en cuanto a gestaciones aparecen reflejados en la Tabla 15. Estos resultados indican que la fertilidad de las hembras tratadas con FSH fue superior a las tratadas con eCG, aunque las diferencias carecían de significación estadística, y que los animales utilizados como donantes de embriones presentaban una buena fertilidad.

	eCG	FSH
Preñada	9(39.1%)	10(58.8%)
Vacía	14(60.9%)	7(41.2%)
Total	23(100%)	17(100%)

Tabla 15: Resultados obtenidos al realizar el diagnóstico de gestación a los 20 días de la copula.

DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

Existe un creciente interés mundial en la explotación comercial de los camélidos sudamericanos (llamas, alpacas, guanacos y vicuñas), debido a su elevada demanda por las empresas agrarias productoras de fibras naturales de alta calidad y, recientemente, por el sector de animales de compañía. La inducción de ovulaciones múltiples junto con la transferencia de embriones (MOET) podría incrementar el número de descendientes obtenidos a partir de las hembras genéticamente superiores, facilitando la difusión de sus genes en el conjunto de la población. Sin embargo, la adaptación de las tecnologías reproductivas desarrolladas en otras especies a los camélidos, resulta difícil debido a las particularidades de su fisiología reproductiva y a los escasos conocimientos relativos a la misma, lo que obliga a desarrollar procedimientos adaptados a estas especies.

La experiencia adquirida tras muchos años de investigación en las diferentes especies domésticas, ha demostrado que para obtener una buena respuesta ovárica es preciso administrar el tratamiento hormonal durante la emergencia de la oleada de crecimiento folicular y en ausencia de un folículo dominante (Monniaux y col., 1983). Sin embargo, las particularidades fisiológicas de los camélidos sudamericanos dificultan el empleo de este procedimiento. Estas especies son de ovulación inducida y, por lo tanto, no existen fases luteales espontáneas (Novoa, 1970; Sumar, 1985) y, además, el folículo dominante se mantiene activo durante periodos muy prolongados (Bravo y col, 1990a).

Los estudios encaminados a desarrollar un protocolo de superovulación apropiado para los camélidos domésticos son muy escasos y han sido realizados mayoritariamente con llamas, utilizando un número de animales (Aller y col., 2002b; Bourke y col, 1995; Correa y col, 1994, 1997; Palomino, 1996). Los resultados obtenidos por estos autores demuestran la existencia de una gran variabilidad en la respuesta y unas tasas de recuperación de embriones muy bajas. En algunos casos la administración de las hormonas se realizó durante la fase folicular, provocando la emergencia de una oleada de crecimiento folicular mediante la ablación quirúrgica del folículo dominante (Ratto et al., 2005) o en presencia del mismo (Velásquez y Novoa, 1999). Sin embargo, el procedimiento más habitual es administrarlo durante una fase luteal, bien sea natural, tras provocar la ovulación de un folículo dominante y la formación de un cuerpo lúteo, o artificial mediante la administración de progestágenos por vía subcutánea o intravaginal (Aba y col, 1999; Alberio y Aller 1996; Bourke y col., 1992b; Chaves y col, 1998, 2002).

Los escasos estudios realizados en alpacas se han efectuado mayoritariamente durante una fase luteal artificial, no existiendo ningún trabajo en el que se evalúe la respuesta ovárica de los animales cuando los tratamientos hormonales son administrados durante una fase luteal inducida.

Nuestro estudio pretende evaluar la respuesta a las gonadotropinas durante una fase luteal natural. Por ello, se inició comprobando la presencia de un folículo dominante en crecimiento, con un diámetro \geq de 7 mm y administrando una dosis de 4 μ g de buserelina. Esta actuación nos permitió conseguir la ovulación y formación del cuerpo lúteo en la totalidad de los animales tratados, generando así una fase luteal natural. La mayor parte de los trabajos existentes indican que para provocar la ovulación en llamas o alpacas es necesario administrar una dosis de 1000 μ g de GnRH (Adán y col, 1989; Bourke y col, 1995a; Bravo y col, 1992; Ladrix y col, 1992; Huanca y col, 2001) o de 8 μ g de buserelina (Bourke y col, 1992b). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que una dosis de 4 μ g de buserelina es suficiente para la inducción de la ovulación en las alpacas y coinciden con los descritos previamente por Arainga y col (2003), quienes compararon el efecto de la administración de dosis de 4 y 6 μ g.

El número medio de folículos con un diámetro comprendido entre 7 y 13 mm, observados en las hembras sometidas al tratamiento de estimulación ovárica durante una fase luteal inducida fue de $8,98 \pm 6,84$, con un rango comprendido entre 0 a 27 folículos. Este amplio rango demuestra la existencia de una gran variabilidad en la respuesta individual, hecho que ha sido descrito previamente por numerosos autores (Bourke y col, 1992a; Correa 1997; Del Campo y col, 1996c; Ratto y col, 1997). En nuestro caso el número de animales que no respondió al tratamiento fue muy bajo, solamente 3 hembras, por lo que el procedimiento utilizado parece ser bastante adecuado para conseguir la superovulación en la alpaca.

Otro dato interesante observado por nosotros es que el 56,1% (23/41) de los animales presentaba un cuerpo lúteo a los 7 días del inicio del experimento, lo que indicaba que no se había completado la luteolisis como respuesta a la prostaglandina administrada. La presencia de dichos cuerpos lúteos no ejerció un efecto significativo sobre el número de folículos de 7 a 13 mm, siendo este muy similar para ambos grupos (8,82 frente a 8,16). Además, la presencia de cuerpos lúteos no estaba condicionada por la situación fisiológica de los animales (lactantes, no lactantes), ni por la hormona utilizada (FSH, eCG). No existe ningún trabajo en el que se mencione la presencia de cuerpos lúteos a los 7 días del inicio del tratamiento, pero dado que no parecen influir

en la respuesta ovárica, pensamos que podrían encontrarse en fase de regresión y por lo tanto habría cesado su capacidad para producir progesterona. En este sentido, existen algunos estudios que indican que el cuerpo lúteo de los camélidos es capaz de responder a los agentes luteolíticos entre los días 6 y 8 postovulación (Bourke y col, 1992). No obstante, sería muy interesante valorar la evolución de la progesteronemia en estas hembras.

El análisis de los resultados obtenidos al evaluar la respuesta ovárica de los animales puso de manifiesto que la hormona utilizada ejercía un efecto estadísticamente significativo en el número de folículos menores de 7 mm y en el número de folículos preovulatorios (diámetro de 7 y 13 mm).

El número de folículos de diámetro inferior a los 7 mm fue mayor en las hembras tratadas con FSH (5,82 frente a 3,17). Esta situación no ha sido descrita previamente y podría indicar que la dosis de FSH o pauta de administración utilizada no son adecuadas para estimular el crecimiento folicular en esta especie. Sin embargo, la dosis utilizada por nosotros (200 mg) es similar a la empleada por otros autores que oscila entre 200 y 220 mg (Correa y col, 1997; Gamarra y col, 2007; Ratto y col, 1997; 2007). Por otra parte, algunos estudios realizados en otras especies demuestran que cuando se incrementa la dosis de FSH se provoca una reducción del porcentaje de ovulaciones (Kanitz y col, 2002). Nuestros resultados podrían indicar que la velocidad de crecimiento de los folículos reclutados como respuesta al tratamiento con FSH es menor y, por ello, tardarían más tiempo en adquirir la capacidad de responder a la descarga preovulatoria de LH. En este sentido, un experimento realizado por Ratto y col (1997) en el que se administraron 200 mg de pFSH repartidos durante 5 días, demostraba que el número de cuerpos lúteos se incrementaba sensiblemente cuando la monta se retrasaba hasta las 36 horas de la finalización del tratamiento superovulatorio.

El número de folículos preovulatorios fue superior en las hembras tratadas con eCG (9,74 frente a 5,8). Sin embargo, la mayor parte de los autores consultados indican que se obtienen mejores resultados utilizando FSH cuando el tratamiento hormonal se administra durante una fase luteal inducida (Velásquez y Novoa, 1999; Novoa y col, 1999). Sin embargo, otros autores obtienen las mejores respuestas al aplicar un tratamiento en el que combinan FSH y eCG tanto en llamas y alpacas (Alberio y col, 1996; Bourke y col, 1995a; Chaves y col, 1998; Aba y col, 1999; Velásquez y col, 1999; Agüero y col, 1999), como en camellos (Nowshari y col, 2005). En la mayoría de las especies domésticas los resultados obtenidos con FSH siempre superan a los logrados con eCG, aunque generalmente lo que se evalúa es el número

de embriones transferibles (Eldsden y col, 1978; Armstron y Evans, 1983). No obstante, los resultados obtenidos por los diferentes autores al utilizar FSH resultan difícilmente comparables, debido a las grandes variaciones en la bioactividad del producto utilizado o de los diferentes lotes de un mismo producto, ya que existe una gran variabilidad en cuanto a su contenido en LH (Braileanu y col, 1998; Lindsell y col, 1986). No existe una opinión unánime respecto al efecto de la contaminación con LH sobre la respuesta ovárica y la cantidad y calidad de los embriones obtenidos. Así, algunos autores señalan que cuanto mayor es la pureza del producto mayor es el número de ovulaciones y la calidad de los embriones (Yamamoto y col, 1993), mientras que otros señalan que cuando la contaminación de LH es muy baja se producen alteraciones en la maduración de los ovocitos, en la fecundación y el desarrollo embrionario (Herrler y col, 1991). Además, la administración de FSH bovina recombinante no permite incrementar el número de embriones transferibles, ni reducir la variabilidad en la respuesta (Wilson y col, 1993). Tampoco podemos descartar que los peores resultados que hemos obtenido en los animales tratados con FSH sean consecuencia del estrés provocado por el manejo de los animales, ya que es necesario repetidas administraciones del producto (dos inyecciones diarias durante 5 días consecutivos). Así, en un estudio realizado por Bo y col (1994) utilizando novillas *Bos indicus*, demostraron que una única inyección subcutánea de Folltropin-V permitía obtener mejores respuestas que la administración del preparado 2 veces al día durante cuatro días consecutivos. Por ello, consideramos interesante realizar nuevos estudios para evaluar el efecto de la administración del preparado una vez al día durante varios días o incluso de una única inyección de la hormona administrada por vía subcutánea.

La condición fisiológica de los animales y la interacción condición*hormona no afectaron de manera significativo a la respuesta al tratamiento, lo que parece indicar que la lactación no repercute sobre la respuesta al tratamiento. No obstante, en las hembras lactantes el número de folículos preovulatorios obtenidos fue superior. No existen datos bibliográficos en los que se analice la respuesta superovulatoria de las alpacas en base a su situación fisiológica. Sin embargo, algunos autores han señalado que en las hembras lactantes se produce un acortamiento del intervalo entre dos oleadas de crecimiento folicular consecutivas y una disminución del diámetro final alcanzado por el folículo dominante (Adams, 1990), lo que indicaría la existencia de algunas diferencias en su funcionalidad ovárica.

En resumen, la administración del tratamiento hormonal durante una fase luteal inducida permite obtener una buena respuesta ovárica en las alpacas, con independencia de su situación fisiológica, obteniéndose mejores respuestas cuando se

administra eCG en única inyección. Además, Los resultados obtenidos por nosotros al utilizar eCG durante una fase luteal inducida superan a los descritos por otros autores que administraron el mismo tratamiento durante una fase luteal artificial (Bourke y col, 1995a). Ello podría ser debido a que la administración exógena de progesterona no provoca la regresión del folículo dominante (Bourke y col, 1995a) que posteriormente puede ovular y transformarse en un cuerpo lúteo, por la acción LH de la eCG, en este caso el cuerpo lúteo así formado sería incapaz de responder a la acción luteolítica de la $\text{PGF}_{2\alpha}$.

El análisis morfométrico de las estructuras presentes en los ovarios a los 7 días del inicio del tratamiento puso de manifiesto que los valores obtenidos para los diferentes grupos considerados eran bastante homogéneos. No obstante, pudimos comprobar que la hormona utilizada determinaba la existencia de diferencias en el diámetro medio de los folículos incluidos en la categoría de 7 a 13 mm. Así, en las hembras tratadas con eCG el diámetro medio de dichos folículos fue superior al de las tratadas con FSH (9,01 frente a 8,31). No existe ningún trabajo previo en el que haya analizado esta variable, pero nuestros resultados sugieren que la velocidad de crecimiento folicular es mayor en los animales tratados con eCG. Otro dato que apoya esta hipótesis es que, como hemos señalado previamente, en los animales tratados con eCG el número de folículos con diámetro inferior a 7 mm es significativamente inferior al de los que recibieron FSH. Los resultados obtenidos por Driancourt y Fry (1992), al evaluar el crecimiento y la maduración de los folículos de ovejas tratadas con FSH o eCG, demostraron que la eCG determinaba una mayor velocidad de crecimiento folicular y mayor producción de estradiol. A partir del momento en el que se establece la selección, el crecimiento folicular está regulado por la LH, por lo que el menor tamaño de los folículos presentes en el ovario de las hembras tratadas con FSH podría ser consecuencia de la necesidad de competir por la LH presente en el torrente circulatorio. Así, algunos estudios previos demuestran que el diámetro de los folículos dominantes que crecen como respuesta de un tratamiento superovulatorio con FSH es inferior al alcanzado por el folículo dominante que se forma durante una oleada de crecimiento natural (Adams, 1999).

Un porcentaje importante de los animales tratados (34,1%) desarrollaron folículos quísticos, cuyo número variaba entre 1 y 7. El análisis estadístico nos permitió comprobar que la hormona utilizada influía de manera significativa en la presencia de estas estructuras, siendo mucho más frecuentes en las hembras tratadas con eCG. Este hecho ha sido descrito previamente tanto en alpacas (Correa y col, 1994), como en llamas (Bravo y col, 1995c), estos últimos autores señalan que la administración de

eCG provoca quistes foliculares en un 20% de los animales y que la frecuencia de presentación de estas estructuras anormales se incrementa al aumentar la dosis de eCG (Bravo y col, 1995c). La presencia de folículos quísticos no ejercía un efecto estadísticamente significativo sobre número de cuerpos lúteos observados 6 días después de la monta. Sin embargo, nuestros resultados indicaban que las hembras que presentaron un folículo quístico desarrollaron posteriormente un mayor número de cuerpos lúteos, independientemente de la hormona utilizada para provocar la superovulación.

En la segunda parte del primero de nuestros experimentos tratamos de comprobar la existencia de relaciones entre la respuesta ovárica al tratamiento y la producción de embriones. Sin embargo, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los animales en los que se obtuvieron embriones y los que no se obtuvo ninguno, siendo la respuesta ovárica muy homogénea en ambos grupos.

No obstante, en las donantes tratadas con FSH en las que no se recuperó ningún embrión se apreció un mayor número de folículos < de 7mm ($6,09 \pm 0,97$). Mientras que en las tratadas con eCG, en las que no se obtuvo ningún embrión, había una mayor presencia de folículos con un diámetro de 7 a 13 ($10,16 \pm 2,08$). Estos datos parecen indicar nuevamente que el protocolo de administración de la FSH o la dosis utilizada no permite incrementar la velocidad de crecimiento folicular de manera adecuada en esta especie, de tal forma que una parte importante de los folículos no habrían alcanzado el diámetro mínimo necesario para responder a la descarga preovulatoria de LH, repercutiendo negativamente en la producción de embriones. La ausencia de una estrecha correspondencia entre la respuesta ovárica y la producción de embriones podría estar indicando la interferencia de la superovulación con la maduración de los ovocitos, la ovulación o el transporte de los gametos o de los embriones. Algunos autores han señalado que la superovulación afecta a la maduración nuclear y citoplásmica de los ovocitos disminuyendo su capacidad para ser fecundados y soportar el posterior desarrollo embrionario (Sirad y col, 2000). Sin embargo, estos efectos no han sido estudiados aún en los camélidos sudamericanos. Tampoco podemos descartar la influencia del momento en el que realizamos el lavado y la destreza del operador en el número de embriones obtenidos.

La evaluación de la respuesta al tratamiento mediante el recuento del número de cuerpos lúteos presentes en el ovario antes de proceder al lavado del útero nos permitió comprobar que el 93,18% de las hembras tratadas respondieron al tratamiento (2 ó más cuerpos lúteos). Así, solamente hubo tres hembras que no

respondieron al mismo al no presentar ningún cuerpo lúteo o tener solamente uno. Estos resultados son sensiblemente superiores a los obtenidos por Aller y col (2002b) en llamas, estos investigadores observaron que un 20% de los animales no respondían al tratamiento de eCG durante una fase luteal artificial, inducida mediante la inserción intravaginal de un CIDR. El número de cuerpos lúteos obtenido por nosotros fue de $7,73 \pm 4,44$ (rango comprendido entre 0 y 18), siendo similar al descrito en llamas (Correa et al, 1997) y bastante superiores a los obtenidos por otros investigadores en esta misma especie (Aller y col, 2002b; Bourke y col, 1992). La información existente en alpacas es muy escasa, ya que solamente hemos encontrado un trabajo en el que se hace referencia al número de cuerpos lúteos observados en el ovario tras la superovulación (Velásquez y Novoa, 1999). En dicho artículo se señala que el número de cuerpos lúteos fue mayor en las hembras que recibieron la eCG durante una fase luteal artificial, frente a los animales que recibieron la gonadotropina durante una fase folicular (17,80 frente a 8,20).

Al analizar la influencia de la situación fisiológica de las donantes, las hormonas utilizadas y la interacción entre ambas sobre el número de cuerpos lúteos, hemos observado que únicamente la hormona ejercía un efecto estadísticamente significativo, siendo el número de cuerpos lúteos superior en las hembras tratadas con eCG. Estos resultados son contrarios a los obtenidos en llamas por Correa y col (1997), quienes observaron un mayor número de cuerpos lúteos en los animales tratados con FSH, a pesar de que las hembras tratadas con eCG presentaban un mayor número de folículos preovulatorios. Estos autores indican que la utilización de eCG para estimular la actividad ovárica interfiere con la ovulación, debido a que su larga vida media que provocaría la luteinización de los folículos. Las diferencias observadas con nuestros resultados podrían ser consecuencia de la mayor efectividad del procedimiento que hemos empleado para inducir la ovulación (monta + administración de GnRH). Algunos autores demuestran que la administración de GnRH en el momento de la monta incrementa el porcentaje de ovulaciones y reduce el periodo necesario para que se complete la ovulación, cuando en el ovario existen múltiples folículos (Adam y col, 1992b).

Es interesante señalar que, en nuestras condiciones experimentales, el número de folículos anovulatorios presentes en el ovario en el momento de realizar el lavado del útero fue muy bajo y, además, no hemos observado diferencias en función de la hormona utilizada, a pesar de que el único animal que presentaba 7 folículos anovulatorios había sido tratado con eCG. Sin embargo, la aparición de folículos anovulatorios es muy habitual cuando se realiza la superovulación tanto en llamas

(Aller y col, 2002, Bourke y col, 1995a), como en vicuñas (Aller y col, 2002). Algunos autores indican que la administración de eCG provoca un mayor incremento en la frecuencia de aparición de folículos anovulatorios que la FSH, debido a su prolongada vida media (Correa y col, 1997). Sin embargo, las condiciones de trabajo empleadas por estos investigadores difieren de las utilizadas en nuestros experimentos, puesto que administraron eCG durante 3 días consecutivos o combinaron eCG y FSH. Otros estudios realizados en ovino demuestran que el tratamiento con FSH produce la misma incidencia de folículos anovulatorios que la eCG (González-Bulnes y col, 2000). La aparición de folículos anovulatorios ha sido atribuida a que la administración de gonadotropinas exógenas provoca el rescate de folículos en etapas iniciales de atresia (Rubianes y col, 1997).

Srenan y Beehan, (1974) señalaron que el objetivo de los tratamientos superovulatorios es estimular el crecimiento folicular sin provocar un excesivo edema ovárico o la aparición de folículos anormalmente grandes, consiguiendo un número adecuado de folículos capaces de ovular y formar cuerpos lúteos normales. Los resultados obtenidos por nosotros al administrar FSH o eCG durante una fase luteal inducida cumplen dicho objetivo, por lo cual nos parece un procedimiento apropiado para lograr la superovulación en las alpacas.

En el segundo de nuestros experimentos hemos evaluado la recogida de embriones mediante el lavado del útero a los 7 días de la cópula. La elección del momento mas apropiado para realizar el lavado esta basada en la información existente en la mayor parte de la bibliografía consultada (Bourke y col., 1995a, Ratto y col., 1999; Huanca y col., 2006), no obstante, algunos autores realizaron el lavado del útero entre los 8 y 8,5 días posteriores al coito (Aller y col., 2002b). Diversos estudios indican que el desarrollo embrionario es muy rápido en los camélidos. Así, a los cuatro días del coito aparecen en el oviducto embriones de 4-8 células (Bravo y col, 1996a) y a los 7 días los embriones migran al útero como blastocistos eclosionados (Ratto y col., 1999; Huanca y col., 2006). Algunos estudios previos indicaban que en los camélidos los embriones migran al útero a los 5-6 días de la ovulación, en forma de blastocistos en eclosión o recién eclosionados (Del campo y col., 1995a; McKimon y col., 1992). En un estudio preliminar realizado por nosotros, cuyos resultados aún no han sido publicados, en el que realizamos el sacrificio de 24 alpacas en días diferentes después de la cópula, pudimos comprobar que el tránsito desde el oviducto al útero se producía unas horas antes del día 7. Además, en ensayos previos hemos comprobado que cuando el lavado del útero se realiza antes del día 7 o en los días 8 ó 9 no se obtiene ningún embrión. Algunos autores señalan que la recuperación de embriones se puede realizar a los 7, 8

y 9 días (Taylor y col., 2001), lo que no coincide con nuestras experiencias. Es necesario señalar que estos investigadores efectúan la recogida sin previa estimulación hormonal del ovario, lo que podría indicar que en estas condiciones la migración de los blastocistos al útero se produce de forma más tardía.

Solamente obtuvimos embriones en 18 de las 34 hembras donantes utilizadas (52,94%), siendo nuestros resultados inferiores a los descritos por Aller y col. (2002b) en llamas (83,4%). Estas diferencias pueden ser atribuidas a las diferencias entre especies, ya que el mayor tamaño de las llamas facilita la manipulación de su útero por vía rectal. Hemos obtenido 49 embriones, lo que representa un porcentaje de recuperación del 41,1%, con respecto al número de cuerpos lúteos presentes en el ovario. Nuestros resultados son similares a los descritos por Correa y col. (1997) (47,7%), superiores a los indicados por Ratto y col (1997) (30%) e inferiores a los de Aller y col. (2002b) (84,6%). Es necesario señalar que todos estos investigadores han desarrollado sus experimentos con llamas y que no existen datos bibliográficos referentes a alpacas. Además, hemos observado la existencia de una gran variabilidad individual entre donantes, ya que el número de embriones obtenidos estaba comprendido en un rango de 1 y 7 embriones/donante, situación que coincide con lo descrito previamente por otros autores (Bourke y col, 1992; Correa y col., 1997). El porcentaje de embriones recuperados está condicionado por diversos factores entre los que se ha destacado por su importancia la incapacidad de la fimbria oviductal para captar todos los ovocitos liberados, el día en el que se efectúa la recogida (Taylor y col., 2001; Novoa y col., 1999) y el procedimiento utilizado para el lavado del útero (Bourke y col., 1995, Ratto y col., 1999; Huanca y col., 2006).

El porcentaje de animales en los que no se obtuvo ningún embrión fue superior en el grupo de hembras tratado con FSH (70,58 frente a 52,94%), lo que podría ser consecuencia de que en estos animales exista un retraso en la ovulación y por lo tanto en la migración del oviducto al útero, pudiendo producirse entre los días 8 y 9, tal y como observaron Taylor y col. (2001) en hembras no superovuladas.

Con respecto a las características de los embriones obtenidos, hemos recuperado 36 blastocistos eclosionados (73,46%) y 13 mórulas (26,53%). En la mayor parte de los animales se obtuvieron únicamente blastocistos, aunque algunas hembras produjeron mórulas y blastocistos y otras solamente mórulas. En ningún caso hemos recuperado ovocitos sin fecundar, lo que podría indicar que en los camélidos el porcentaje de fecundación es muy elevado, como sugieren Correa y col (1997), o bien la existencia de algún mecanismo que impide su migración desde el oviducto al útero.

Algunos autores han señalado la existencia de un mecanismo de selección, localizado en la unión útero-tubárica, que solamente permite el paso de los embriones que han alcanzado un desarrollo adecuado (Novoa y col, 1999), tal y como sucede en la yegua (Betteridge y Mitchell, 1974). Los datos existentes en la bibliografía con respecto a las características de los embriones son diversos. Así, algunos autores señalan la presencia de mórulas, blastocistos y blastocistos expandidos (Palomino y col, 1986; Correa, 1992a; Wiptz y Chapman, 1985), mientras que otros únicamente encuentran blastocistos eclosionados (Aller y col, 2002b; Bourke y col, 1992c; 1995; Correa, 1994; 1997). La presencia de mórulas en el útero contradice las afirmaciones de Bourke y col (1992c), quienes señalan que únicamente es posible obtener mórulas mediante el lavado del oviducto a los 3 días de producirse la ovulación.

Los porcentajes de blastocistos obtenidos de hembras tratadas con FSH (41,66%) y con eCG (58,33%) fueron muy similares lo que difiere con lo señalado por otros autores (Velásquez y Novoa, 1999; Ratto y col, 1999) quienes observaron que en las llamas la FSH permite obtener un mayor número de blastocistos cuando se administra en dosis decrecientes durante 5 días consecutivos en el transcurso de una fase luteal inducida.

La existencia o no de lactación tampoco afectó a los resultados en cuanto a la producción de embriones, no obstante, el mayor número de blastocistos se obtuvo al administrar FSH en las hembras lactantes y eCG en las no lactantes, aunque las diferencias observadas carecían de significación estadística. Un aspecto que llama la atención es que la mayor parte de las mórulas obtenidas procedían del grupo de hembras lactantes (92,30%), mostrando el análisis estadístico un efecto altamente significativo sobre este parámetro. No existen datos bibliográficos con respecto a la influencia de la lactación en la producción de embriones en los camélidos y las características de los mismos.

La distribución de los embriones obtenidos en cada uno de los cuernos uterinos (derecho e izquierdo) era bastante homogénea. Sin embargo, se obtuvo una mayor cantidad de blastocistos del cuerno derecho y un mayor número de mórulas en el izquierdo. Además, la calidad de los embriones procedentes del cuerno derecho parecía ser superior.

Al evaluar la calidad de embriones recuperados pudimos comprobar que la utilización de FSH permitió obtener un mayor número de embriones catalogados como excelentes, mientras que el empleo de eCG permitió obtener un mayor número de

embriones incluidos dentro de la categoría de buenos, aunque las diferencias observadas carecían de significación estadística. Esta observación coincide con lo descrito en otras especies domésticas, puesto que se indica que los embriones producidos por las hembras tratadas con FSH son de calidad superior (Elsden y col, 1978; Monniaux y col, 1983). Algunos estudios endocrinos han demostrado que en las vacas tratadas con eCG son más frecuentes los perfiles anormales de LH y progesterona en las vacas tratadas con eCG (Greve, 1983; Mikel-Jenson y col, 1982), lo que se ha asociado con una reducción en los porcentajes de ovulación y fecundación (Callesen y col, 1986).

La mayor parte de los trabajos realizados en camélidos tan solo consideran el efecto de la situación ovárica en el momento de la recogida sobre la producción de embriones (Aller y col, 2002b; Ratto y col, 1997). Nosotros hemos evaluado también el efecto de la presencia o ausencia de un cuerpo lúteo en el momento de la cópula sobre los resultados finales. Así, hemos podido comprobar que 22 de los 36 blastocistos obtenidos (61,11%) procedían de hembras que presentaron un CL en el momento de cópula y tan solo 14 (38,88%) de las que no lo presentaban. Además, todos los animales que produjeron 4, 6 ó 7 embriones en el mismo lavado se caracterizaban por presentar un cuerpo lúteo en el momento de la cópula. Estos datos parecen indicar que la regresión tardía del cuerpo lúteo no afecta a la ovulación y que ejerce un efecto beneficioso sobre la producción de embriones. No obstante, es necesario realizar nuevos experimentos retrasando el momento de la administración de la prostaglandina para verificar la validez de esta hipótesis.

Tal y como hemos señalado previamente, algunas de las hembras tratadas presentaban folículos anovulatorios en el momento del lavado del útero. Sin embargo, nuestros resultados indican que su presencia no afecta al número de embriones obtenidos, ni a la calidad de los mismos. Esta misma situación ha sido observada previamente por Aller y col (2002b) en llamas superovuladas durante una fase luteal inducida, ya que estos autores tampoco observaron ninguna influencia de los mismos sobre la producción de embriones. En un estudio realizado por Veiga-López y col (2006) en la especie ovina, se comprobó que los folículos anovulatorios no repercutían negativamente en la cantidad y calidad de los embriones producidos. Estos autores comprobaron que la mayor parte de los folículos anovulatorios tenían una escasa capacidad estrogénica. Sin embargo, cuando los folículos anovulatorios eran altamente estrogénicos, afectaban negativamente a la cantidad de embriones producidos, al disminuir considerablemente el porcentaje de ovocitos fecundados (Veiga-López y col, 2006).

Todos los blastocistos obtenidos por nosotros se encontraban en la fase de blastocisto eclosionado, lo que implica que la pérdida de la zona pelúcida se produce antes de migrar desde el oviducto al útero. El tamaño de los blastocisto era muy variable y estaba comprendido en un rango de 200 a 1150 μm , valores similares a los señalados previamente por Bourke y col (1992c) y Del Campo y col (2002). Por lo que respecta a las mórulas, su diámetro era sensiblemente inferior y estaba comprendido en un rango entre 150 a 250 μm . No existe ningún trabajo previo en el que se mencionen las dimensiones de las mórulas en los camélidos sudamericanos. Cuando se realiza la recogida a los 7 días de la monta los blastocistos que aparecen con mayor frecuencia son aquellos cuyo diámetro está comprendido entre 400 y 600 μm , representando un 47,22% del total.

Al analizar la influencia de los diferentes factores considerados (condición, hormona, localización del cuerpo lúteo y sus interacciones), pudimos comprobar que tanto la situación fisiológica de las hembras como la hormona utilizada influían de manera significativa sobre el diámetro de los blastocistos. Así, los procedentes de hembras no lactantes y de las tratadas con eCG presentaron un mayor diámetro. Desconocemos el significado de esta observación, aunque podría indicar que en estos animales el desarrollo es más rápido o que los embriones tienen mayor edad por haberse producido la ovulación antes que en los restantes grupos.

Dado que no existe ningún estudio previo en el que se establezcan los criterios para determinar la calidad de los embriones de alpaca o llama, hemos adaptado los criterios descritos por Stringfellow y col (1998) para evaluar la calidad de los embriones bovinos. Utilizando estos criterios pudimos comprobar que la mitad de los blastocistos obtenidos eran excelentes (50,0%) y el resto estaban distribuidos en las categorías de buenos (27,8 %), regulares (11,1 %) y malos (11,1 %). No fuimos capaces de establecer ninguna correlación entre el tamaño de los embriones y su calidad.

En el tercero de nuestros experimentos hemos evaluado el porcentaje de gestación tras la transferencia no quirúrgica de los embriones recién obtenidos. Independientemente de la localización del cuerpo lúteo, todas las transferencias se realizaron en el tercio anterior del cuerno uterino izquierdo, tal y como está indicado en el caso de los camélidos (Musa y col, 1993). En estas especies el 98% de las gestaciones se localizan en dicho cuerno, a pesar de que los cuerpos lúteos de gestación se distribuyan de forma homogénea entre ambos ovarios (Bravo y col, 1993). De las 32 transferencias realizadas 14 dieron lugar a gestación (43,75%). El porcentaje de gestación obtenido por nosotros es similar al señalado por Bourke y col (1995) y

superior al indicado por Taylor y col (2000) utilizando embriones recogidos en los días 7 y 8.

Los embriones transferidos habían sido clasificados dentro de la categoría excelente, buena, regular y mala y los porcentajes de gestación obtenidos para cada una de estas categorías fueron de 50, 45, 45 y 0%, respectivamente. Estos datos demuestran que los criterios que hemos aplicado para determinar la calidad de los embriones resultan adecuados para esta especie.

Al evaluar la influencia del diámetro de los embriones sobre la gestación, pudimos comprobar que únicamente se lograron gestaciones cuando el diámetro de los embriones transferidos estaba comprendido entre 400 y 1000 μm . Estos resultados coinciden parcialmente con lo descrito previamente en llamas por Bourke y col (1995), quienes señalan que las gestaciones se consiguieron únicamente cuando el diámetro de los embriones transferidos estaba comprendido entre 600 a 1200 μm . No existe ningún estudio en el que se evalúe el efecto del grado de sincronía entre la edad del embrión y la etapa de desarrollo luteal de las receptoras. Sin embargo, la gran amplitud en el rango de tamaños podría indicar que en esta especie es menos crítico que en otras. En las alpacas las fases luteales inducidas tras una cópula infértil o mediante la administración de hormonas son muy cortas, aproximadamente 10 días (Bravo y col, 1991b), por lo que a los 7 días de la ovulación está a punto de iniciarse la luteolisis por lo que los blastocistos transferidos deben ser capaces de emitir rápidamente las señales necesarias para el reconocimiento maternal de la gestación. En un estudio reciente realizado por Powell y col (2007), se ha demostrado que los blastocistos de llamas producen cantidades crecientes de $17\mu\text{-estradiol}$ entre los días 7 y 15 de gestación. Algunos autores indican que una asincronía negativa de 24-48 horas entre la inducción de la ovulación en la donante y las receptoras podría contribuir a incrementar las tasas de gestación en camélidos (Musa y col, 1993).

En el cuarto de nuestros experimentos nos permitió comprobar que la utilización de las hembras como donantes de embriones no afecta a su posterior capacidad reproductiva, ni supone un grave retraso en la recuperación de la misma. Nuestros resultados indican que el 50% de las hembras donantes presentan un folículo preovulatorio a los 7 días de la realización del lavado, lo que supone el reinicio inmediato de las oleadas de crecimiento folicular, y esta cifra alcanzó valores del 90 % a los 28 días de la recogida.

Al analizar la influencia de la hormona administrada durante el tratamiento superovulatorio sobre la aparición de folículos preovulatorios durante los 28 días posteriores a la recogida pudimos comprobar que la recuperación de la actividad ovárica era más rápida en las hembras tratadas con FSH.

Las hembras donantes fueron sometidas a monta controlada y posterior diagnóstico de gestación, lo que nos permitió comprobar que un 47,5 % de las mismas quedaron gestantes. Este valor es sólo ligeramente inferior al obtenido en alpacas en condiciones naturales durante la misma campaña (Huanca y col, 2006), lo que demuestra que la utilización de las hembras como donantes no afecta negativamente a su posterior capacidad reproductiva. Además hemos comprobado que los porcentajes de gestación obtenidos en las hembras tratadas con FSH (58,8%) son superiores a las que recibieron eCG (39,1%), lo que indica que la recuperación de la actividad ovárica es más rápida en las primeras.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1ª.- La superovulación de las alpacas durante una fase luteal natural, inducida mediante la administración de buserelina, permite obtener un número de folículos preovulatorios similar al logrado al aplicar estas hormonas durante una fase luteal artificial. La respuesta mostró una gran variabilidad, pero el número de animales que no respondieron al tratamiento fue muy bajo.

2ª.- El número de folículos menores de 7 mm fue mayor en las hembras tratadas con FSH y el número de folículos preovulatorios fue superior en las que recibieron eCG. Además, los folículos preovulatorios presentaron mayor diámetro en las hembras tratadas con eCG. Sin embargo, no hemos conseguido establecer ninguna correlación entre la respuesta ovárica y el número y calidad de los embriones producidos.

3ª.- Un porcentaje importante de los animales tratados (24,1%) desarrollaron folículos quísticos, siendo mucho más frecuente en las hembras tratadas con eCG.

4ª.- El recuento del número de cuerpos lúteos nos permitió comprobar que la mayor parte de las hembras tratadas respondieron positivamente al tratamiento (93,18%), obteniéndose un valor medio para el número de cuerpos lúteos de $7,73 \pm 4,44$ y un número muy bajo de folículos anovulatorios. La hormona utilizada ejercía un efecto estadísticamente significativo sobre el número de cuerpos lúteos, siendo esta cifra superior en las hembras tratadas con eCG.

5ª.- El lavado del útero a los 7 días de la copula permite obtener embriones en esta especie, aunque el porcentaje de animales en los que se logró (47,06%) y la tasa de recuperación (41,1%) son sensiblemente inferiores a los logrados en otras especies domésticas.

6ª.- La mayor parte de los embriones recuperados fueron blastocistos eclosionados y solamente unos pocos fueron morulas, no existiendo diferencias atribuibles a la hormona utilizada o a la situación fisiológica de las hembras. No obstante, en las hembras tratadas con FSH se obtuvieron más embriones catalogados como excelentes.

7ª.- La situación fisiológica de las hembras y la hormona utilizada influían de manera significativa en el diámetro de los blastocistos, siendo mayor en los procedentes de hembras no lactantes y de las tratadas con eCG. No obstante, no hemos observado ninguna correlación entre el diámetro de los blastocistos y su calidad.

8ª.- La transferencia de los embriones a las hembras receptoras nos permitió obtener un porcentaje de gestación del 43,75%. Las gestaciones se obtuvieron únicamente al transferir blastocistos catalogados como excelentes y buenos y cuando su diámetro estaba comprendido entre 400 y 1000 μm .

9ª.- La utilización de las hembras como donantes no afectó a la posterior recuperación de su actividad ovárica, ni a su capacidad para iniciar una nueva gestación. Sin embargo, la utilización de FSH determinó que la recuperación de la actividad ovárica fuera más rápida lo que repercutió favorablemente en el porcentaje de gestación.

RESUMEN

VIII. RESUMEN

Existe un creciente interés mundial en la explotación comercial de los camélidos sudamericanos para la producción de fibras naturales de alta calidad. Sin embargo, el número de reproductores cuya fibra tiene un diámetro comprendido entre 18 y 21 micras es muy escaso, lo que obliga a aplicar la biotecnología de la reproducción al objeto a incrementar la eficacia de los programas de mejora genética. Los resultados obtenidos hasta al momento al aplicar la inseminación artificial no son muy alentadores, por lo que la transferencia de embriones parece ser la mejor alternativa para incrementar el número de descendientes obtenidos a partir de los ejemplares de mayor potencial genético. Sin embargo, los camélidos tienen importantes diferencias fisiológicas que dificultan la utilización de los procedimientos desarrollados en otras especies domesticas. Recientemente se han iniciado diversos estudios para desarrollar procedimientos de estimulación ovárica apropiados para las alpacas y las llamas, pero la mayor parte de los mismos señalan la existencia de grandes variaciones en la respuesta y bajas tasas de recuperación de embriones. Por todo ello, el objetivo que nos hemos planteado en el presente trabajo es el de contribuir al desarrollo de la transferencia de embriones en alpacas, evaluando la respuesta a diferentes tratamientos hormonales, la tasa de recuperación de embriones y las características de los mismos, el porcentaje de gestación tras la transferencia a hembras receptoras y los efectos de la utilización como donantes en la posterior eficiencia reproductiva.

Para la realización de este estudio se emplearon un total de 85 alpacas adultas con edades comprendidas entre los 4 y 8 años pertenecientes al Centro de Investigación y Producción Quimsachata del Instituto Nacional de Investigación Agraria, Puno Perú, encontrándose todas ellas en buen estado nutricional y sanitario.

En el primero de los experimentos se utilizaron 45 alpacas (20 vacías en la campaña anterior y 25 en lactación), que fueron superovuladas utilizando FSH (aplicada a 5 alpacas no lactantes y a 17 lactantes) y eCG (administrada a 8 alpacas no gestantes y a 15 lactantes). Los tratamientos se iniciaron a las 48 h de la inducción de la ovulación del folículo dominante con GnRH. Nuestros resultados demostraron que la administración de gonadotropinas durante una fase luteal inducida, permite obtener un número de folículos preovulatorios similar al conseguido al administrar dichas hormonas durante una fase luteal artificial. El número medio de folículos preovulatorios fue de $8,98 \pm 6,84$ y, aunque la magnitud de la respuesta fue variable, el número de animales

que no respondieron al tratamiento fue muy bajo. En las hembras tratadas con FSH se observó un mayor número de folículos menores de 7 mm y en las que recibieron eCG el número de folículos preovulatorios fue mayor. Además, en estas últimas los folículos preovulatorios alcanzaron un mayor diámetro. Un porcentaje importante de las hembras tratadas (34,1%) desarrollaron folículos quísticos, siendo mucho más frecuentes en las que recibieron eCG. Sin embargo, no hemos conseguido establecer ninguna correlación entre la respuesta ovárica y el número y calidad de los embriones producidos.

El recuento del número de cuerpos lúteos presentes en el ovario antes de realizar el lavado del útero, nos permitió comprobar que la mayor parte de las hembras tratadas (93,18%) habían respondido positivamente al tratamiento, obteniéndose un número medio de cuerpos lúteos de $7,73 \pm 4,44$, cifra sensiblemente superior a la observada por otros autores en esta especie. Los mejores resultados se obtuvieron en las hembras tratadas con eCG.

El lavado del útero a los 7 días de la cópula permitió obtener embriones en un 47,06% de los animales, además, la tasa de recuperación fue muy baja (41,1%). La mayor parte de los embriones recuperados fueron blastocistos eclosionados y solamente unos pocos eran mórulas. No hemos encontrado diferencias atribuibles a la hormona utilizada o a la situación fisiológica de las hembras, aunque en las hembras tratadas con FSH se obtuvo un mayor número de embriones catalogados como excelentes.

El diámetro de los blastocistos obtenidos estaba comprendido en un rango muy amplio (200 a 1150 μ) y estaba influido significativamente por la situación fisiológica de las hembras y la hormona utilizada. Así, los blastocistos procedentes de hembras no lactantes y de las tratadas con eCG presentaron mayor diámetro. No obstante, no hemos observado ninguna correlación entre el diámetro de los blastocistos y su calidad.

Para la realización del tercero de nuestros experimentos hemos transferido un total de 32 embriones de calidad excelente, buena y regular a igual número de hembras receptoras, todas las transferencias se realizaron en el cuerno uterino izquierdo independientemente de la localización del cuerpo lúteo. Hemos conseguido un total de 14 gestaciones (43,75%), un 50% cuando el blastocisto era excelente, 45,45% cuando era bueno y 0% cuando era regular, demostrando que los criterios empleados por nosotros para la evaluación de los embriones fueron adecuados para esta especie.

El último de los experimentos realizados en esta Tesis nos permitió comprobar que la utilización de las hembras como donantes no afectaba a la posterior recuperación de su actividad ovárica, ni a su capacidad para desarrollar una nueva gestación. No obstante, en las hembras tratadas con FSH la actividad ovárica se recuperó con mayor rapidez repercutiendo favorablemente en su capacidad para quedar nuevamente gestantes.

IX. SUMMARY

There is a growing wide-world interest in the commercial exploitation of sudamerican camels to produce high quality natural fibers. Unfortunately, the number of breeding animals having a fiber diameter between 18 and 21 microns is very scarce and this raised the need for applying reproductive biotechnologies to increase the efficiency of the genetic programs. Up to now, the use of artificial insemination in sudamerican camels has reported very poor results, so embryo transfer seems to be the best choice to increase the offspring from individuals with high genetic value. Embryo transfer procedures developed for other domestic species are difficult to be used in camels due to important physiological differences. Recent studies designed to develop specific procedures for ovarian stimulation in alpacas and llamas showed that, in general, there is a high individual variation in the response to hormonal treatments and a low rate of embryo recovery.

The aim of the present study was to contribute to the development of embryo transfer in alpacas by evaluating the response to different hormonal treatments, the rate of embryo recovery and embryo quality, the pregnancy rate of receptor females, as well as the subsequent reproductive efficiency of donor females.

A total of 85 alpacas with ages between 4 and 8 years were used for this study. The animals belonged to the Quimsachata Research and Production Center of INIA, Puno-Perú, being all of them in good nutritional and health status.

In the first study we used 45 alpacas (13 non-pregnant in the previous season and 32 lactating females) which were superovulated using FSH (applied to 5 non lactating and 17 lactating alpacas) or eCG (applied to 8 non lactating and 15 lactating alpacas). Superovulatory treatments were initiated 48 h after ovulation induction of the dominant follicle with GnRH. Our results showed that the mean number of preovulatory follicles was 8.98 ± 6.84 and, although the magnitude of the response was variable, the number of animals not responding to the hormonal treatments was very low.

In females treated with FSH, a higher number of follicles with a diameter lower than 7 mm was observed, whereas in females treated with eCG the number of preovulatory follicles and the size they reached was higher. An important proportion of the treated females (34.1%) developed cystic follicles being this much more frequent in females receiving eCG. However, no relationship could be established between the ovarian response and the number and quality of the embryos produced.

By counting the number of corpora present in the ovary before uterine flushings we determined that most of the treated females (93,18%) had responded to both treatments, having a mean number of 7.73 ± 4.44 corpora lutea. This number was appreciably higher than that previously observed by other authors in this species. The best results were obtained in females treated with eCG.

The second study was aimed to evaluate the embryo recovery rate and the quality of the embryos recovered. Washing of the uterus 7 days after mating allowed us to obtain embryos from 47.06% of the animals, however, the recovery rate was very low (41,1%) as compared with that obtained by other authors. Most of the recovered embryos were hatched blastocysts and only a few morulas were found. We didn't find differences due to the hormone used or the physiological status of the female, although in females treated with FSH we obtained a higher number of embryos scored as excellent.

Blastocysts diameter was within a wide range (from 200 to 1150 μm) and it was significantly influenced by the female physiological situation and the hormone used. Blastocysts obtained from non lactating females or those treated with eCG showed higher diameters. However, no relationship was observed between blastocysts quality and diameter.

In the third experiment we transferred a total of 32 embryos, scored with excellent (18), good (10) and regular (4) quality, to an equal number of receptor females. All the transfers were done on the left uterine horn independently of the localization of the corpus luteum. We obtained a total of 14 pregnancies (43.75%): 50% when the blastocyst was excellent, 45.45% when it was good, and 0% when it was regular, showing that the method used to evaluate embryo quality was adequate to this species.

The last experiment done in this thesis, allowed us to prove that the utilization of females as embryo donors neither affected to the subsequent recovery of their ovarian activity nor to their capacity to develop a new gestation. However, in the females treated with FSH, the ovarian activity was recovered more quickly which had a favourable impact on their capacity to be pregnant again.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aba M, Forsberg M, Kindahl H, Sumar J y Edqvist L (1995a): Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet. Scand.* **36**, 489-498.
- Aba, M A (1995): Studies on the reproductive endocrinology of llamas and alpacas from mating throughout early pregnancy. Master Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. pp: 11-78.
- Aba M A, Quiroga MA, Auza N, Forsberg M y Kindahl H (1995b): Control of ovarian activity in llamas (*Lama glama*) with medroxyprogesterone acetate. *Reprod. Dom. Anim.* **34**, 471-476.
- Aba M A, Bravo P W, Forsberg M y Kindahl H (1997): Endocrine changes during early pregnancy in the alpaca. *Animal Reproduction. Science.* **47**, 273-279.
- Aba M A, Sumar J, Kindahl H, Forsberg M y Edqvist L E (1998): Plasma concentrations of 15-ketodihydro-PGF (2- α), progesterone, estrone sulfate, estradiol -17- β and cortisol during late-gestation, parturition and the the early postpartum period in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science.* **50**, 111-121.
- Aba M A, Kindahl H, Forsberg M, Quiroga M A y Auza N (1999a): Levels of progesterone and changes in prostaglandin f2 α release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Animal Reproduction Science.* **59**, 87-97.
- Aba M A, Quiroga M A, Auza N, Forsberg, M y Kindahl H (1999b): Control of ovarian activity in llamas (*Lama glama*) with medroxiprogesterone. *Reprod. Domest. Anim.* **34**, 471-476.
- Aba M A, Miragaya M H, Capdevielle E F, Rutter B y Agüero A (2005): Effect of exogenous progesterone and eCG treatment on follicular dynamics in vicuñas (*Vicugna vicugna*). *Anim. Reprod. Sci.* **86**, 153-161.
- Abd-Elnaeim M M, Pfarrer C, Saber S A, Abou-Elmagd A Jones C J y Leiser R (1999): Fetomaternal attachment and anchorage in the early diffuse apitheliochorial placenta of the camel (*Camelus dromedarius*). *Cell Tissue Organ.* **164**, 141-154.

- Adam C L, Moir C E y Shiach P (1989): Plasma progesterone concentrations in pregnant non-pregnant llamas (*Lama glama*). Vet. Rec. **125**, 618-620.
- Adam C L Bourke D A, Kile C E, Young P y McEvoy T G (1992a): Ovulation and recovery in the llama. In: Allen W R, Higgins A J, Mayhew I G, S Now D y Wade J F (Eds), Proc. Inst Int. camel Conf. R&W Pub., Newmarket. pp: 125-127.
- Adam C L y Bourke D A (1992b): Ovulation and embryo recovery in the llama in: Proceedings of the First International Camel Conference, Dubai, 2-6 February.
- Adams G P, Griffin P G y Ginther O J (1989): In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. Biolgy of Reproduction. pp: 551-558.
- Adams G P, Sumar J y Ginther O J (1990): Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). J. Reprod. Fert. pp: 535.
- Adams G P, Sumar J y Ginther O J (1991a): Form and function of the corpus luteum in llamas. Anim. Reprod. Sci. **24**, 127-138.
- Adams G P, Sumar J y Ginther O J (1991b): Hemorrhagic ovarian follicles in llamas. Theriogenology. **35**, 557-568.
- Adams G P, Matteri R L, Kastelic J P, Ko J CH y Ginther O J (1992a): Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fert. **94**, 177-188.
- Adams G P, Matteri R L y Ginther O J (1992b): Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. J. Reprod. Fertil. **96**, 627-664.
- Adams G P (1997): Pregnancy diagnosis in the llama. In: RS Younquist, editor. Current therapy in large animal theriogenology. Philadelphia, PA: Saunders. pp: 808-12.
- Adams G P (1998): Control of ovarian follicular wave dynamics in mature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. Proc. World Buiatrics Congress. 595-605.

- Adams G P (1999): Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. J. Reprod. Fertil. Suppl. **54**, 17-32.
- Adams G P y Ratto M H (2001): Reproductive biotechnology in South American Camelids. Rev Inv.Vet Perú. Suppl. **1**, 134 -141.
- Agüero A, Chaves M G, Capdevielle E F y Russo A (1999): Superovulación en llamas: comparación de dos tratamientos. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp: 94.
- Agüero A, Miragaya M H, Ferrer M S, Capdevielle, E F, Chaves M G y Rutter B (2001): Follicular dynamics in (*Vicugna vicugna*). Theriogenology. **34**, 1119-1127.
- Alarcón V, Sumar J, Riera G S y Foote W C (1990): Comparison of three methods of pregnancy diagnosis in alpacas and llamas. Theriogenology. **55**, 1119-1127.
- Alberio R H y Aller J F (1996): Control y sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de progesterona exógena en llamas. Rev. Arg. Prod. Anim. **16(4)**, 325-329.
- Aller J F, Cancino A K y Rebuffi G E y Alberio R H (1999): Inducción de la ovulación en llamas (ovulation induction in llamas) In: Proceedings of the Second World Congreso on Camelids, Cusco, Perú, 4-7 November. pp: 91.
- Aller J F, Rebuffi G E y Cancino A K (2002a): Superovulación response to progestogen – eCG treatment in vicugna (*Vicugna vicugna*) in semicaptive conditions. Theriogenology. **57**, 576.
- Aller J F, Rebuffi G E, Cancino A K y Alberio R H (2002b): Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. Animal Reproduction Science. 73, 121- 127.
- Ampuero E y Alarcón V (1988): Evaluación de diferentes métodos de diagnóstico de gestación en alpacas. Libro de Resúmenes VI Convención Internacional de especialistas en camélidos, Oruro Bolivia.
- Anouassi A, Adnani M y Raed E I (1992): Artificial insemination the camel requires induction of ovulation to achieve pregnancy. In: Allen, W R, Higgins A J, Mayhew

IG, Snow D H y Wade J F (Eds), Proc. Ist.Int. Camel Conf.. R&W Publications (Newmarket), UK. pp: 175-178.

Araínga M (2002): Estudio del efecto de la GnRH en el proceso de reconocimiento maternal de la preñez sobre la sobrevivencia embrionaria en alpacas (*Lama pacos*). Tesis Bach. Fac. Med. Vet. UNMSM. Lima-Perú. pp: 5 1.

Araínga M R, Leyva V, García W y Franco E LI (2003): Efecto de la GnRH en el proceso del reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. Rev. Inv. Vet. Perú. **14 (2)**, 104-110.

Arthur G H, Rahim A T A y Hindi A S A (1985): Reproduction and genital diseases of the camel. Br. Vet. J. **141**, 650-659.

Armstrong D T y Evans G (1983): Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. Theriogenology. **19**, 31-42.

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

Bazer F W (1992): Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **199**, 373-384.

Bazer F W, Spencer T E y Ott T L (1996): Placental interferons. Am. J. Reprod. Inmunol. **35**, 297-308.

Bazer F W y Thatcher W (1977): Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F_{2α} by the uterine endometrium. Prostaglandins. **14**, 397-401.

Betteridge K J y Mitchell D (1974): Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. J. Reprod. Fertil. **39**, 145-148.

Bianchi C P, Meikle A, Sartore I, González F y Aba M A (2007): Uterine estrogen receptor alpha and progesterona receptor during the follicular and luteal phase in llamas. Animal Reproduction Science. **99**, 117-126.

- Bo G A, Caccia M, Martinez M, Adams G P, Pierson R A y Mapeltoft R J (1994): The use of estradiol and progestogen treatment for the control of follicular wave dynamics in beef cattle. *Theriogenology*. **40**,165.
- Bourke D, Adam C y Kyle C E (1992a): Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Vet. Rec.* **130**, 424-428.
- Bourke D, Adam C, Kyle C, Young P y Mc Evo T G (1992b): Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. *Procc. 12th Congress on Animal Reproduction, Vol. 1 The Hague, 23-27 August.* pp:193-195.
- Bourke D A, Adam C L, Kyle C E, Young P y Mc Evo T G (1992c): Superovulation and embryo transfer in the llama. In: Allen WR, Higgins AJ, Mayhew IG, Snow D, Wade JF (Eds), *Proceedings of the First International Camel Conference.* R&W Publications, Newmarket. 183-185.
- Bourke D A, Adam C L y Kile C E (1992d): Ultrasonography an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Vet. Rec.* **130**, 424-428.
- Bourke D A, Kyle C E, Mc Evoy T G, Young O y Adam C L (1995a): Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology*. **44**, 255-268.
- Bourke D A, Adam C L, Kile C, Young P y Me Evoy T G (1995b): Recipient synchronization, and embryo transfer in South American camelids. *Theriogenology*. **43**, 171.
- Bourke D A (1998): An introduction to the unique reproductive physiology and breeding activity of SACs. *Proc. Crossing Boundaries*, 7-10.
- Bono G, Dahir A M y Comin A (1989): Plasma LH, Corticoid and sex steroid variations in camels (*Camelus dromedarius*). In relation to seasonal climatic changes. *Anim Reprod Sci.* **21**, 101-113.
- Burton M, Burton R y Marshall C Corp (1969): *The International Wildlife Encyclopedia.* B.P.C. Publishing Limited, New York. **10**, 1329-1331.

- Blanco C E, Giussani D A, Riquelme R A, Hanson M A y Llanos A J (1997): Carotid blood flow with behavioral states in the late gestation llama fetus in utero. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **104**, 137-141.
- Braileanu G T, Albanese C, Card C y Chedrese P J (1998): FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology* **49**, 1031-1037.
- Bravo W, Sumar J y Riera S G (1985): Factors that determine fertility in alpacas. In: *Proceedings of the International Convention on SAC*. pp: 4.
- Bravo W, Sumar J y Riera S G (1987): Reproductive wastage in female alpaca. In: *Improving Reproductive Performance of Small Ruminants*, Utah State University, Logan, UT. pp: 155.
- Bravo W M y Fowler M E (1988a): Aplicación de la técnica de ultrasonografía en alpacas y llamas. VI Convención Internacional de Especialistas en Camélidos. Programa y Resúmenes de trabajos. Oruro-Bolivia. pp: s/n.
- Bravo W M, Fowler M E, Lasley B y Stabenfeldt G H (1988b): Hormonas folículo estimulante y luteinizante en llamas. VI Convención Internacional de Especialistas en Camélidos. Programa y Resúmenes de trabajos. Oruro-Bolivia pp: s/n.
- Bravo W M y Sumar J (1989): Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal Reproduction Science.* **21**: 271-281.
- Bravo W M, Fowler M E, Stabenfeldt G H y Lasley B L (1990a): Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology Reproduction.* **43**, 579-585.
- Bravo W M, Fowler M E, Stabenfeldt G H y Lasley B L (1990b): Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology.* **33**, 891-899.
- Bravo W M, Stabenfeldt G H, Fowler M E y Lasley B L (1991a): Urinary steroids in the periparturient and postpartum periods through early pregnancy in llamas. *Theriogenology.* **36**, 267-278.
- Bravo W M, Stabenfeldt G H, Lasley B L y Fowler M E (1991b): The effect of ovarian follicular size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *Biol. Reprod.* **45**, 553-559.

- Bravo W M, Stabenfeldt G H, Fowler M E y Lasley B L (1992): Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotropin-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biol. Reprod.* **47**, 884-888.
- Bravo W y Varela M H (1993): Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). *Anim. Reprod. Sci.* **32**, 245-252.
- Bravo W M, Fowler M E y Lasley B L (1994): The postpartum llama: fertility after parturition. *Biol. Reprod.* **51**, 1084-1087.
- Bravo W M, Lasley B L y Fowler M E (1995a): Resumption of ovarian follicular activity and uterine involution in the postpartum llama. *Theriogenology.* **44**, 783-791.
- Bravo W, Pezo D y Alarcon V (1995b): Evaluation of early reproductive performance in the postpartum alpaca by progesterone concentrations. *Anim. Reprod. Sci.* **39**, 71-77.
- Bravo W M, Tsutsui T y Lasley B L (1995c): Dose response to equine chorionic gonadotropin and subsequent ovulation in llamas. *Small Rumin. Res.* **18**, 157-163.
- Bravo W M, Moscoso J, Ordoñez C y Alarcon V (1996a): Transport of spermatozoa and ovarian in female alpaca. *Anim. Reprod. Sci.* **43**, 2-3.
- Bravo W M, Steward, D R, Lasley B L y Fowler, M E (1996b): Hormonal indicators of pregnancy in llamas and alpacas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **208**, 2027-2030.
- Bravo W M, Sidkmore J A y Zhao X (2000): Reproductive aspects and storage of semen camelids. *Anim. Reprod. Sci.* **62**, 173-193.
- Brogliatti G, Palasz, Rodrigues-Martinez H, Mafletoft R y Adams G P (2000): Transvaginal collection and ultrastructural of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology.* **54**, 8, 1269-1279.
- Brown B W, Eney N J y Matettner P E (1980): Ovarian arterial blood velocity measured with Doppler ultrasonic transducers in conscious ewes. *J. Reprod. Fertil.* **58**, 295-300.

- Brown B W y Radziewic T (1998): Production of sheep embryos in vitro and development of progeny following single and twin embryo transfer. *Theriogenology*. **49**, 1525-1536.
- Brown B W (2000): A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*. **58**, 169-195.
- Bryant F S y Florez, A J (1989): Sheep and alpaca productivity on high Andean rangelands in Perú. *J. Anim. Sci.* **67**, 3087-3095.
- Cancino A K, Aller J F, Rebuffi G y Alberio R H (1999): El uso del norgestomet para la sincronización de la onda folicular en llamas en dos épocas del año (invierno y verano). II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp: 93.
- Callejas S, Alberio R, Cabodevilla J, Aller J, Catalana R, Teruel M y Dulout F (2003): Efecto de la administración de progesterona sobre la dinámica folicular y la respuesta ovárica a tratamiento superovulatorio en bovinos. In: Quinto Simposio Internacional de Reproducción Animal-IRAC. pp: 407.Abst.
- Callesen H, Greve T y Hyttel P (1986): Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*. **25**, 71-86.
- Cárdenas O, Ratto M, Cordero y Huanca W (2003): Evaluación de pérdida fetal temprana en llamas mediante Ultrasonografía. In: Proceedings of the III Congreso Mundial Sobre Camélidos, Potosí, Bolivia. pp: 709-711.
- Centro de Investigación Tecnológica (2006): CITE-Alpaca. Diagnóstico del Sector Alpaquero en el Perú. Programa de Innovación Tecnológica MTINCI – AECI . Lima-Perú.
- Cooper M J, Skidmore J A, Allen W R, Wensworth S, Billah M, Ali-Chaudry M y Billah A M (1992): Attempts to stimulate and synchronize ovulation and superovulation in dromedary camels for embryo transfer. In: Allen, WR., Higgins, AJ., Mayhew, IG., Snow, DH., Wade, JF. (Eds), Proc. Ist. Int. Camel Conf. R&W Publications (Newmarket), UK. pp: 175-178.

- Condorena N y Velasco J (1977): Comparación de dos sistemas de empadre en la alpaca. Resúmenes de Proyectos de Investigación UNMSM, Tomo II, Lima-Perú. pp: 98.
- Correa J, Gatica R, Ratto M H, Ladrix R y Schuler C (1992a): Studies on non surgical recovery of embryos from South American camelids. Proceedings of the 12th Congress on Animal Reproduction. Vol. 2, 23-27 August. pp: 788-790.
- Correa J, Ratto M H, Ladrix R. y Gatica R (1992b): Obtención de preñez en una llama por transferencia de embriones. Arch. Med. Vet. **24**, 113-115.
- Correa J, Ratto M H y Gatica R (1994): Actividad estral y respuesta ovárica en alpacas y llamas tratadas con progesterone y gonadotropinas. Arch. Med. Vet. **26**, 59-64.
- Correa J, Ratto M H y Gatica R (1997): Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. Animal Reproduction Science. **46**, 289-296.
- Curtis J L (1992): Embryo transfer procedure. ED: Academia Press, In.
- Chaves M G, Agüero A, Egey J, Flores M y Rutter B (1998). Sincronización de la onda folicular en llamas utilizando un dispositivo intravaginal (CIDR). In: Proceedings of the XVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. p:139.
- Cháves M G, Aba M A, Agüero A, Egey J, Berestin V y Rutter B (2002): Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. Animal Reproduction Science. **69**, 37-46.
- Chen B X, Yuen Z X y Pan G W (1985): Semen induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J. Reprod. Fétil. **73**, 335-339.
- Chipayo Y (2002): Estudio del efecto del estradiol alrededor del reconocimiento maternal de la preñez sobre la sobrevivencia embrionaria en alpacas. Tesis Bach. Fac. Med. Vet. UNMSM. Lima-Perú. pp: 47.
- Davis G H, Dodds K G, Moore G H y Bruce G D (1997): Seasonal effects on gestation length and birth-wight in alpacas. Anim. Reprod. Sci. **46**, 297-303.

- Davis G H (1999): Longer gestations and smaller birth weights in spring-born alpacas. *Alpacas Registry J.* **4**, 31-36.
- Dehlon G y Von Lawzewitsch I (1994): Reproduction in the male llama (*Lama glama*), a South American camelid: I. Spermatogenesis and organization of the intertubular space on the mature testis. *Acta Anat.* **129**, 59-66.
- Del Campo M R, Del Campo C H y Adams G P (1995a): The application of new reproductive technologies to South American camelids. *Theriogenology.* **43**, 21 - 30.
- Del Campo M R, Del Campo C H, Mapletoft R J y Guinther O J (1995b): Morphology and location of attached follicular cumulus-oocyte complexes in horses, cattle and llamas. *Theriogenology.* **43**, 533 - 542.
- Del Campo M R, Del Campo C H, Donoso M X y Ginther O J (1996a): Recuperación y morfología de ovocitos de llamas (*Lama glama*). I Congreso Mundial sobre camélidos. Cajamarca-Perú. pp: 7.
- Del Campo M R, Del Campo C H y Guinther O J (1996b): Vascular provisions for a local utero-ovarian cross-over pathway in New World camelids. *Theriogenology.* **46**, 983-991.
- Del Campo M R, Del Campo C H, Donoso M X y Ginther O J (1996c): Efecto de diferentes características de la hembra en la recuperación y morfología de ovocitos de llamas. I Congreso Mundial sobre Camélidos. Cajamarca-Perú. pp: 5.
- Del Campo M R, Toro F, von Baer A, Montecinos S, Donoso X y von Baer L (2002): Morphology and physiology of llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama paco*) embryos. *Theriogenology.* **57**, 581.
- D'occhio M J, Novoa C y Vera W G (1997): Ovarian follicle regression and emergence of a new follicular wave after injection of 17 β -oestradiol in alpacas. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* **29**, 102.
- Drew M L, Alexander B M y Sasser R G (1995): Pregnancy determination by use of pregnancy-specific protein-B radioimmunoassay in llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **207**, 217-219.

- Driancourt M A, Thatcher W W, Terqui M y Andrieu D (1991): Dynamics of ovarian follicular development in cattle during estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Dom. Anim. Endocrinol.* **8**, 209-221.
- Driancourt M A y Fry R C (1992): Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Anim Reprod Sci.* **27**, 279-292.
- England B G, Foote W C, Matthews D H, Cardozo A G y Riera S (1969): Ovulation and Corpus luteum function in the llama (*Lama glama*). *J. Endocr.* **45**, 505-513.
- England B G, Foote W C, Cardozo A G, Matthews D H, y Riera S (1971): Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). *Anim. Behav.* **19**, 722-726.
- Elsden R P, Nelson L D y Seidel GE (1978): Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology.* **9**, 17-26.
- Elwishy A B (1987): Reproduction in the female dromedary (*Camelus dromedarius*): A review. *Animal Reprod Sci.* **15**, 273-297.
- Elwishy A B (1992): Functional morphology of the ovaries of the dromedary camel. In: Allen W R, Higgins A J, Mayhew I G, Snow D H y Wade J F (Eds), *Proc. Inst Camel Conf.* R&W Publications (Newmarket), UK. pp: 149-154.
- Escobar R C (1984): Mating, parturition. In: Hennig, R. (Ed.), *The llama, animal breeding and production of South American Camelids.* Talleres Graficos de Abril, Lima-Perú. pp: **358**, 103-139; 229-247.
- Fernández - Baca S y Novoa C (1968): Conducta sexual de la alpaca (*Lama pacos*) en empadre a campo. *A.L.P.A. Memoria.* **3**, 7-20.
- Fernandez-Baca S (1970) Luteal function and the nature of reproductive failures in the alpaca. Ph.D. Thesis. Cornell Univ. Ithaca, New York.
- Fernández-Baca S, Maden D H L y Novoa C (1970a): Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J. Reprod. Fert.* **22**, 261-267.

- Fernández Baca S, Hansel W y Novoa C (1970b): Embryonic mortality in the alpaca. Biol. Reprod. **3(2)**, 243-251.
- Fernández-Baca S, Hansel W y Novoa C (1970c): Corpus luteum function in the alpaca. Biol. Reprod. **3**, 252-261.
- Fernández-Baca S (1971): La alpaca, reproducción y crianza. Boletín de Divulgación N° 7. IVITA. UNMSM, Lima-Perú. pp: 14-38.
- Fernández-Baca S, Novoa C y Sumar J (1972a): Actividad reproductiva en la alpaca mantenida en separación del macho. Mem. ALPA. **7**, 7-18.
- Fernández-Baca S, Sumar J y Novoa C (1972b): Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. Revista Invest Pecuarías. **1**. 115-128.
- Fernández-Baca S, Sumar J y Novoa C (1973): Relación entre la ubicación del cuerpo lúteo y la localización del embrión en la alpaca. Revista Invt. Pecuarías. (IVITA) UNM San Marcos. Lima-Perú. **2**, 131-135.
- Fernández-Baca S, Novoa C y Sumar J (1974): Pubertad en alpacas. Avances de Investigación. Bol. de Div. N° 15 IVITA UNM San Marcos. Lima-Perú. pp: 129-138.
- Fernández-Baca S, Hansel W, Saatman R, Sumar J y Novoa C (1979): Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. Biol. Reprod. **20**, 586-595.
- Fernández Baca, S (1993): Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. Anim. Reprod. Sci. **33**, 307-323.
- Ferrer M S, Agüero A, Flores M y Rutter B (1999a): Citología vaginal en distintas fases de la dinámica folicular en la llama (*Lama glama*). Revista Brasileira Reprod. Anim. July Sep. **23**, 207-209.
- Ferrer M S, Agüero A, Flores M y Rutter B (1999b): Follicular dynamics control in llamas (*Lama glama*) using intravaginal sponges with medroxyprogesterone. J. Camel. Prac. Res. **6**, 277.

- Fowler M E (1989): Medicine and surgery of South American Camelids. Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco. Iowa State University Press, Ames.
- Fowler M E, Olander, H J (1990): Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). Am. J. Vet. Res. **51**, 1495-1500.
- Fowler M E y Bravo, P W (1998): Reproduction. In: Fowler, M.E. (Ed), Medicine and Surgery of South American Camelids, second ed. Iowa State University Press, Ames, USA. pp: 381-429.
- Franco E, Sumar J y Varela M (1981): Eyaculación en la alpaca (*Lama pacos*). IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Corporación Nacional Forestal. Instituto de la Patagonia, Chile, Punta Arenas, 22-27 de noviembre.
- Franco E, Ordoñez C y Ampuero E (1999): Retorno del celo y fertilidad de alpacas post superovulación utilizando PGF_{2α}. XXI Reunión Científica Anual APPA. Huancavelica-Perú. pp: 86.
- Franklin W L (1983): Contrasting socioecologies of South America`s wild camelids: The vicuña and the guanaco, Eisenbery, J. F., Kleinman, D. G (Eds), Advances in the Study of Mammalian Behaviour. Am. Soc. Mammal. **7**, 573-629.
- Freyre G (2006): Experiencias de transformación y comercialización de la fibra de alpacas. Conferencia Internacional de Camélidos Sudamericanos. 30-31 de Marzo, Arequipa-Perú.
- Gamarra G, Gallegos M, Asparrin M y Vivanco W (2007): Development of superovulatory strategies in alpacas. Reproduction Fertility and Development **19(1)**, 238-238.
- Gatica R, Ratto M, Schuler C, Ortiz M, Oltra J y Correa J E (1994): Cría obtenida en una llama (*Lama glama*) por transferencia de embriones. Agric. Técnica (Chile). **54**, 68-71.
- Geisert R D, Renegar R H, Thatcher W W, Roberts R M y Bazer F W (1982a): Establishment of pregnancy in the pig: I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. Biol. Reprod. **27**, 925-939.

- Geisert R D, Thatcher W W, Rberts R M y Bazer F W (1982b): Establishment of pregnancy in the pig: III. Endometrial secretory response to estradiol valerate administered on day 11 of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* **27**, 957-965.
- Gomez C, Ratto M H, Berland M, Wolter M y Adams G P (2002): Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology.* **57**, 584. Abst.
- Gonzales-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ y Lopez-Sebastian A (2000): Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology.* **54**, 1055-64.
- González-Mencio F, Manns J y Murphy B D (1978): FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Anim. Reprod. Sci.* **1**, 137-144.
- Gorokhovskii N, Shmidt G, Shagaeva V y Baptidanova I, (1975): Giant cell in the placenta of the bactrian camel in the fetal period of development. *Arkh anat. Gistol. Embriol.* **69**, 41-46.
- Guinther O J (1984): Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mares. *Theriogenology.* **21**, 633-634.
- Guinther O J, Kastelic J P y Knopf L (1989): Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* **20**, 187-200.
- Guilbride P D L y Moro M (1995): Mating behaviour in alpacas. *Veterinary Institute for Tropical and High Altitude Research Quarterly Review (October-December).* 8.
- Gray A P (1954): *Mammalian Hybrids. Technical Communication, N° 10, Commonwealth Bureau of Animal Breeding and Genetics, Edinburgh, Bucks, England.*
- Greve T y Callesen H (1983): Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord Vet Med.* **35**, 408-21.
- Greve T, Avery B y Callensen H (1993): Viability of in-vivo and on vitro-produced bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.* **28**, 164-169.

- Greve T y Callesen H (2004): Integrating new technologies with embryology and animal production. *Reprod Fertil.* **16**,113-22.
- Grimek H J, Gorski J y Wentworth B C (1979): Purification and characterization of bovine Follicle-Stimulating hormone: comparison with ovine follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* **104**, 140-147.
- Hafez, E S E, Ssugie T y Gordon I (1963). Superovulation and related phenomena in the beef cow. I. Superovulatory responses following PMS and HCG injections. *J. Reprod. Pert.* **5**, 359-379.
- Hafez ESE y Hafez B (2002): Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma. Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México. **519**, 33-69.
- Heap R B, Hamon M y Allen W R (1982): Studies on oestrogen synthesis by the equine conceptus. *J. Reprod. Fertil.* **32**, 343-352.
- Herrler A, Elsaesser F, Parvizi N y Niemann H (1991): Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology.* 35 633-643.
- Huanaco E y Rodríguez T (1986): Informe preliminar sobre comparación de los sistemas de empadre en alpacas. Resumen I Convención Nacional en producción de camélidos sudamericanos. Oruro Bolivia. pp: 7-14.
- Huanca T, Cárdenas O, Huanca W, Sapana R y Cordero A (2000): Effect of eCG and hCG on ovarian response in alpaca. 14th International Congress on Animal Reproduction. 2-6 Julio. Stockholm, Suecia.
- Huanca T y Huanca W (2003): Effect of GnRH analogous (acetate of buserelina) and double mating on conception rate in llamas. Abstracts of IX World Conference on Animal Production. 26-31 Octubre. Porto Alegre, Brazil. pp: 219.
- Huanca W, Cárdenas O, Cordero A, Huanca T y Sapana R (1999): Respuesta ovárica a gonadotropinas (eCG y hCG) en alpacas durante la época seca. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp: 92.

- Huanca W, Cárdenas O, Olazábal C, Ratto M, Adams GP (2001): Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. **1**, 462-463.
- Huanca W, Cárdenas O, Huanca T y Cordero A (2002a): Respuesta ovárica a la estimulación hormonal en llamas pre-puberes. *Resúmenes XXV Reunión Científica Anual APPA. Lambayeque-Perú*. pp: 320.
- Huanca W, Cárdenas O, Huanca T y Cordero A (2002b): Perfiles de progesterona y desarrollo del cuerpo lúteo bajo tres estímulos de inducción de ovulación en llamas. *Resúmenes XXV Reunión Científica Anual APPA. Lambayeque-Perú*. pp: 325.
- Huanca W, Ratto M, Santiani A, Cordero A y Huanca T (2004): Embryo transfer in camelids: Study of a reliable superovulatory treatment in llamas. 4th European Symposium on South American Camelids and DECAMA European Seminar, Gottingen, 7 – 9 October, 2004, Germany. Abstracts. Ed. M. Gerken, C. Renieri, M. Gauly and A. Riek.
- Huanca W, González M, Cordero A y Huanca T (2006a): Comportamiento reproductivo de donadoras de embriones, después de un protocolo de superovulación en llamas. *Resumen V Congreso Mundial de Camélidos, Catamarca–Argentina*.
- Huanca W, Ratto M, Cordero A, Santiani A, Huanca T, Cárdenas O y Adams G P (2006b): Respuesta ovárica y transferencia de embriones en alpacas y llamas en la zona altoandina del Perú. *Resumen V Congreso Mundial de Camélidos, Catamarca–Argentina*.
- Huanca W, Palomino J, Cervantes M, Cordero A y Huanca T (2007): Efecto de temperatura de transporte (35° y 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de camal. *Procc. XX Reunión ALPA y XXX Reunión APPA-Cusco. Perú*.
- Hoeida A M Khalil M G R y Taha A A M (1988): Plasma concentrations of progesterone, oestrogens, testosterone and LH-Like activity during the oestrus cycle of the camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* **83**, 593-598.

- IETS, (1983): IETS proposed guide for classification of embryos. Embryo Transfer Newsletter, published by the International Embryo Transfer Society **2**, 9.
- IPAC (2005): Instituto Peruano de alpacas y Camélidos. Documento de trabajo inter-institucional del Sector Alpaquero. Arequipa. Perú.
- Johnston L W (1988): Llama reproduction. In: Johnston, L.W. (Ed.), Llama Medicine Workshop for Veterinarians. Colorado State University, For Collins, Appendix 10b.
- Jones, C J P, Wooding F B P, Abd-Elnaeim M M, Leiser R Dantzer V y Stoddart R W (2000): Glycoylation in the near-term epitheliochorial placenta of the horse, donkey and camel: a comparative study of interbreeding and non-interbreeding species. J. Reprod. Fertil. **118**, 397-405.
- Jones C J, Abd-Elmaeim M, Bevilacqua E, Oliveira L y Leiser R (2002) Comparison of uteroplacental glycosylation in the camel (*Camelus dromedarius*) and alpaca (*Lama pacos*). Reproduction. **123**, 115-126.
- Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner H P y Pöhland R (2002): Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. Reprod. Nutr. Dev. **42**, 587-599.
- Khatir H, Anouassi A y Tibary A (2004): Production of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos by IVM and IVF and co-culture with oviductal or granulosa cells. Theriogenology. **62**, 1175-1185.
- Khatir H, Anouassi A y Tibary A (2005): In vitro and in vivo developmental competence of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos produced in vitro using two culture systems (mKSOMaa and oviductal cell). Reprod. Domes. Anim. **40**, 245-249.
- Khatir H, Anouassi A y Tibary A (2007): Effect of follicular size on *in vitro* developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*) Animal Reproduction Science. **99**, 413-420.
- Knight T W, Death A, Wyeth T y Hill F (1992): Effects of GnRH and of single versus multiple mating on the conception rate in alpacas. Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod. **52**, 311-312.

- Knight T W, Death A F y Wyeth T K (1995): Photoperiodic control of the time of parturition in alpacas (*Lama pacos*). Anim. Reprod. Sci. **39**, 259-265.
- Koford C B (1957): The vicuña and the puna. Ecol. Monogr. **27**, 153-219.
- Laguna V (1986): Manual de crianza alpacas y llamas. Instituto Nacional de Fomento Lanero. La Paz Bolivia. pp: 13-14.
- Larico J (1987): Influencia de la alimentación en la reproducción de la alpaca ALLPAK'A Revista de investigaciones Sobre Camélidos Sudamericanos. Vol. 1 N° 3 UNTA Puno-Perú. pp: 9-45.
- Lasley B L Troedsson, Bravo P W y Haggerty M A (1989): Estrogen conjugate measurements to monitor activity. Theriogenology. **31**, 127-139.
- Lauderdale J W y Zimbelman R G (1974): Techniques in female reproduction. A. detection and synchronization of estrus. In: Hafez, E.S.E. (Ed.), Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger, Philadelphia, USA. pp: 432-436.
- Lattanzi M, Santos C, Chaves G, Miragaya M, Capdevielle E y Judith E (2002): Cryopreservation of Ilama (*Lama glama*) embryos by slow freezing and vitrification. Theriogenology. **57**, 585 (abstract).
- Lauria A, Genazzani A N, Oliva O, Inaudi R, Cremonesi F, Monittola C y Aureli G (1982a): Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced by humanmenopausal gonadotrophin. J. Reprod. Fétil. **66**, 219-225.
- Lauria A, Genazzani A R, Cremonesi F, Crotti S y Barbetti M (1982b): Improved method to induce superovulation in cattle using Human Menopausal Gonadotropin (HMG). Theriogenology. **18(3)**, 357-64.
- Leaman D W y Roberts R M (1992): Genes for trophoblast interferons in sheep, goat, musk ox, and distribution of related genes among mammals. J. Interferons Res. **12**, 1-11.
- León J B Smith, B B, Timm K L y LeCrenn, G (1990): Endocrine changes during pregnancy, parturition and the early post-partum period in the llama (*Lama glama*). J. Reprod. Fétil. **88**, 503-511.

- Leyva V y García W (1999a): Efecto de la progesterona exógena sobre la función del cuerpo lúteo de alpacas. Resumen del II Congreso Mundial de Camélidos. Cusco-Perú. pp: 87.
- Leyva V y García W (1999b): Efecto de la prostaglandina sobre la vida del cuerpo lúteo en alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp: 88.
- Leyva V y García W (1999c): Efecto de la progesterona exógena y endógena en alpacas en celo sobre la ovulación, fertilización y gestación. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp: 89.
- Leyva V y García W (1999d): Efecto de la GnRH sobre la fertilización y sobrevivencia embrionaria en alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp: 90.
- Lichtenwalner A B, Woods G L y Weber J A (1996): Ejaculatory patterns of llama during copulation. *Theriogenology*. **46**, 285-291.
- Lindsell C E, Murphy B D, Mapletofi R J (1996): Superovulation and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*. **26**, 209-219.
- Marie M y Anouassi A (1987): Induction of luteal activity and progesterone secretion in the non-pregnant one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* **80**, 184-192.
- Mapletoft R, Steward B K y Adams G P (2002): Recent Advances in the superovulation in Cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* **42**, 1-11.
- McEvoy T G, Kile C E, Young P, Adam C L y Bourke D A (1992): Aspects of artificial breeding and establishment of pregnancy in South American camelids. In: 12th International Congress on Animal Reproduction. The Netherlands. (paper 573).
- McKimon A y Tinson A, (1992): Embryo transfer in dromedary camels. In Allen W R, Higgins A J, Mayhew I J Mayhew I G, Snow D y Wade J F (Eds). *Proceedings of the first International Camel Conference Newmarket, UK R&W Publications*. pp: 203-208.

- McKinnon A O, Tinson A H y Nation G (1994): Embryo transfer in dromedary camels. *Theriogenology*. **41**, 145-150.
- Memon, M A y Stevens, D K (1997): Termination of unwanted pregnancy in a llama with cloprostenol and subsequent pregnancy: a case report. *Theriogenology*. **61**, 663-671.
- Merk H, Boer M Rath D y Schoon H A (1988): The presence of an additional fetal membrane and its function in the newborn Guanaco (*Lama guanacoe*). *Theriogenology*. **30**, 437-439.
- Mikel-Jenson A., Greve T, Madej A y Edqvist L-E (1982): Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2 treated cow. *Theriogenology* **18**, 33-34.
- Miragaya M H Chaves M G, Capdevielle E F, Ferrer M S, Pinto M, Rutter B Neild D M y Agüero A (2002): In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. *Theriogenology*. **57**, 731.
- Miragaya, M H Aba M A, Capdevielle E F, Ferrer M S, Chaves M G, Rutter B y Agüero A (2004): Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuña (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*. **61**, 663-671.
- Miragaya M, Chaves M G y Agüero A (2006): Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*. **61**, 299-310.
- Monniaux, D, Chupin D y Saumande J (1983): Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. **19**, 55-81.
- Moor R M, Kruij A M y Green D (1984): Intra ovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology*. **22**, 103-116.
- Musa B, Sieme H, Merkt H, Hago B, Cooper M J, Allen W R y Jochle W (1993): Manipulation of reproductive functions in male and female camels. *Animal Reproduction Science*. pp: 289-306.
- Nawito M F, Shalash M R, Hoppe R y Bakha A M (1967) Reproduction in the female camel. *Bull. Anim. Sc. Res. Inst. (Cairo)*. **2**, 87.

- Neely D P y Bravo W (1997): Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. In curret therapy in large animal Theriogenology, Youngquist, Editor, WB Saunders Co. pp: 787-792.
- Novoa C y Sumar J (1968) Colección de huevos in vivo y ensayo de transferencia en alpacas. Boletín extraordinario IVITA – UNMSM, Lima-Perú. **3**, 31 – 34.
- Novoa C (1970): Reproduction in the camelidae. J. Reprod. Fert. (review). **22**, 3-20.
- Novoa C, Fernández-Baca S, Sumar J y Leyva V (1972): Pubertad en la alpaca. Revista de investigaciones pecuarias (IVITA). UNMSM, Lima-Perú. **1**, 29 – 35.
- Novoa C (1991): Fisiología de la reproducción de la hembra; In: Fernández-Baca S. editor. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile. **428**, 91-110.
- Novoa C (1992): Reproducción en camélidos. Rev. Cien. Vet. Perú. 8(**4**): 9-11.
- Novoa C, Franco E, García W y Pezo D (1999): Dosis de Gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. RIVEP. Perú. 10(**1**), 48-53.
- Nowshari M A (2005): The effect of harvesting technique on efficiency of oocyte collection and different maturation media on the nuclear maturation of oocytes in camels (*Camelus dromedarius*). Theriogenology. **63**, 2471–81.
- Nowshari M A y Wani N A (2005): Camelid embryo development in vitro: effect of protein supplement on maturation medium and subsequent culture in two different media on fertilization and development. Reprod Fertil. Dev; in press [abstract].
- Olivera L V (1998): Implantacion embrionria em alpacas. Msc.Thesis, Depto Histologia e Embriologia, ICB-I, University of Sao Paulo, Brazil.
- Olivera L, Zago D, Leiser R, Jones C y Bevilacqua E (2003): Developmental changes at the materno-embryonic interfase in early pregnancy of the alpaca, *Lama pacos*. Anat. Embryol. **207**, 317–331.

- Oliveira L, Zago D, Leiser R, Jones C y Bevilacqua E (2003): Placentation in the alpaca (*Lama pacos*) Anat. Embryol. **207**, 45-62.
- Palasz A T, Rodriguez-Martinez H y Briogliatti G (1997): The ultrustructure of llama (*Lama glama*) blastocysts. Theriogenology. **47**, 401 abstr.
- Palma G (2001): Evaluación morfológica de los embriones bovinos; In: Gustavo A Palma, editor. Biotecnología de la reproducción. INTA. Argentina. **701**, 125-132.
- Palomino H, Medina E, Li O, Gomez E, Sumari E, Clavo N, Alvarez M, Chang S, y Pando L (1996a): Transplante de embriones en alpacas. I Congreso Mundial sobre Camélidos. Cajamarca-Perú. pp: 26.
- Palomino H, Medina E, Li O, Gomez E, Sumari E, Clavo N, Alvarez M, Chang S, y Pando L (1996b): Recolección y transplante de embriones por laparoscopia en alpacas. I Congreso Mundial sobre Camélidos. Cajamarca - Perú. pp: 27.
- Palomino Martorel H (2000): Biotecnología del transplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los andes. A.E.A. Editores Importadores, Perú, P: 266. (Chapter 11)
- Palasz A, Adams G, Brogliatti G y Mapletoft R (2000): Effect of day of collection and of permeating cryoprotectants on llamas (*Lama glama*) embryos and trophoblastic vesicles. Theriogenology. **53**, 41 (abstract).
- Papkoff H (1978): Relationship of PMSG to the pituitary gonadotrophins. En: Control of reproduction in the cow. Ed: J.M. Srennan. Martín Nijhoff, The Hague. pp: 73-86.
- Parraguez V H, Cortez S, Gazitua F G, Ferrando G, MacNiven y Raggi L A (1997): Early pregnancy diagnosis in alpaca (*Lama pacos*) and llama (*Lama glama*) by ultrasound. Anim. Reprod. Sc. **47**, 113-121.
- Perry J S, Heap R B y Amoroso E C (1973): Steroid hormone production by pigs blastocysts. Nature. **245**, 45-47.
- Picton H M, Tsonis C G y Mc Neilly A S (1990): FSH causes a time dependet stimulation of preovulatory follicular growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes

- chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. J. Endocrinology. **126**, 297-307.
- Pierson R A y Ginther O J (1984): Ultrasonography of the bovine ovary. Theriogenology. **21**, 495-504.
- Pollard J C, Littlejohn R P y Scout I C (1991): The sexual behaviour of alpacas imported to New Zealand from Chile. Proc. N. Z. Soc. Anim Prod. **51**, 43-46.
- Pollard J C Littlejohn R P y Scott I C (1994): The effect of mating on the sexual receptivity of female alpacas. Anim. Reprod. Sci. **34**, 289-297.
- Pollard J C Littlejohn R P y More G H (1995): Seasonal and other factors affecting the sexual behaviour of alpacas. Anim. Reprd. Sci. **37**, 349-356.
- Powell S, Bradford B S, Timm K I y Menino Jr A R (2007): Estradiol production by preimplantation blastocysts and increased serum progesterone following estradiol treatment in llamas. Animal Reproduction Science **102**, 66-75.
- Pope W F, Maurer R R y Stormshak F (1982a): Intrauterine, migration of the porcine embryo-Influence of estradiol 17- β and histamine. Biol. Reprod. **27**, 575-579.
- Pope W F Maurer RR y Stormshak F (1982b): Intrauterine migration of the porcine embryo-Interaction of embryo, uterine flushings and indomethacin on myometrial function *in vitro*. J. Anim. Sci. **55**, 1169-1178.
- Powers B E, Jonson L W, Linton L B, Garry F Y Smith J (1990): Endometrial biopsy technique and uterine pathologic findings in llamas. JAVMA. **197**, 1157-1162.
- Raedeke K (1978): El Guanaco de Magallanes. Chile. Su distribución y biología. Corporación Nacional Forestal. Ministerio de Agricultura de Chile. Publicación técnica. N° 4.
- Raggi L, Ferrando G, Parraguez V H, MacNiven V y Urquieta B (1999): Plasma progesterone in alpaca (*Lama pacos*) during pregnancy, parturition and early postpartum. Animal Reproduction Science. **54**, 245-249.

- Raggi L A (2001): Camélidos en Chile: Situación actual y perspectivas. Fondo de Investigación Agropecuaria (FIA). Ministerio de Agricultura.
- Ratto M H, Gatica R y Correa J E (1997): Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*. **48**, 325-330.
- Ratto M N, Gomez C, Wolter M, Berland M y Adams G P (1999): Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp: 96-97.
- Ratto M H, Singh J, Huanca W y Adams G P (2003): Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology*. **60**, 1645-1656.
- Ratto M H (2005): Ovarian follicular synchronization, ovulation and oocyte development in llamas and alpacas. PhD.Thesis.University of Saskatchewan. Saskatoon. Canada. pp: 1-150.
- Ratto M H, Berland M, Huanca W, Singh J y Adams G P (2005): In Vitro and In Vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*. **63**, 2445 –2457.
- Ratto M, Huanca W, Singh J y Adams G P (2006a): Comparison of the effect of natural mating, LH and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Animal. Reproduction Science*. **91** (3-4), 299-306.
- Ratto M, Huanca W, Singh J, Adams G P (2006b): Comparison of the effect of ovulation-inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas, and bulls. *Theriogenology*. **66**, 1102-1106.
- Ratto M, Gomez C, Berland M y Adams G P (2007): Effect of ovarian superestimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science*. **97**, 246-256.
- Ridland M, Knight T W y Wyeth T K (1992): Measurement of foetal size by ultrasonography and progesterone concentrations in pregnant alpacas. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* **52**, 191-193.

- Ridland M, Knight T W, Wyeth T K y Death A F (1993): Time and incidence of foetal mortality in alpacas. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. **53**, 437-438.
- Ríos M (1989): Presencia de un factor de inducción de la ovulación en el semen de la alpaca y toro. MV Thesis, Fac. Med. Vet. UNMSM. Perú. pp: 23.
- Reiner R J, Bryant F C, Farfan R D y Craddock B F (1987): Forage intake of alpacas grazing Andean rangeland in Peru. J. Anim. Sci. **64**, 868-871.
- Roche J F y Ireland J J (1984): Manipulation of ovulation in cattle. Proc. 10th Int. Congr. Reprod. A. I. Urbana -Champaign. Vol IV, 9-17. San Martín M (1961): Fisiología de la reproducción de la alpaca, Anim. Symp. Sobre problemas ganaderos. Lima-Perú. pp: 121- 131.
- Rodríguez R (1959): Ovulación en las alpacas (sum). Vet. Zootec. **11**, 17.
- Rubianes E, Ungerfeld R, Viñoles C, Rivero A y Adams G P (1997): Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. Theriogenology. **47**, 1479-1488.
- San Martín M, Copaira M, Zuñiga J, Rodríguez R, Bustinza G y Acosta L (1968): Aspects of reproduction in the alpaca. J. Reprod. Fertility. **16**, 395-399.
- Sato A y Montoya L (1990): Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*), Anatomía macroscópica. Rev. Camélidos Sudamericanos. **7**, 13.
- Sansinena M J, Taylor S A, Taylor P J, Denniston R S y Godke R A (2003): Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from *in vitro* matured llama oocytes. Cloning Stem Cells. **5**, 191-198.
- Sansinena M J, Taylor S A, Taylor P J, Schmidt E E, Denniston R S y Godke R A (2007): *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. Animal Reproduction Science **99**, 342-353.

- Schams D, Menzer C, Schallenberger E, Hoffman B, Hahn J y Hahn R (1978): Some studies of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. En: Control of reproduction in the cow. Ed: J.M. Sreenan. Martin Nijhoff, The Hague. pp: 122-142.
- Schams M C, Menzer C, Schallenberger E, Hoffman B, Prokopp A, Hahn, y Hahn R (1979): Superovulation in cattle. Hormonal profiles during superovulation with PMSG or pituitary FSH. *Zuchthygiene*. **14**, 11.
- Schmidt C R (1973): Breeding season and notes on some other aspects of reproduction in captive camelids. *Int. Zoo. Yearb.* **13**, 387-390.
- Sghiri A y Driancourt M A (1999): Seasonal effects on fertility and ovarian follicular growth and maturation in camels (*Camelus dromedarius*). *Anim. Reprod. Sci.* **55**, 223-37.
- Sirard M A, Coenen K y Bilodeau S (1992): Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*. **37**, 39-57.
- Sirard M A, Robert C, Gagné D, Barnes F L y Bousquet D (2000): Oocyte quality and embryo production in cattle. *Biocell* 24. **(3)**, 256.
- Skidmore J, Allen W y Heap R (1994): Oestrogen synthesis by the peri-implantation conceptus of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* **101**, 363-367.
- Skidmore J A, Billah M y Allen W R (1995): The ovarian follicular wave pattern in the mated and non-mated dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* **49**, 545-548 Suppl.
- Skidmore J A, Billah M y Allen W R (1996a): Patterns of hormone secretion throughout pregnancy in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* **8**, 863-869.
- Skidmore J A, Wooding, F B P y Allen W R (1996b): Placentation during the first 60 days of gestation in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). In: Proceedings of the International Conference on Camelids: Science and Productivity, vol. **4**, 199-202.

- Skidmore J A, Wooding, F B P y Allen W R (1996c): Implantation and early placentation in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Placenta*. **17**, 253-262.
- Skidmore J, Allen W y Heap R (1997): Maternal recognition of pregnancy in the dromedary camel. *J. Camel Practice and Research*. **4(2)**, 187-192.
- Skidmore J A, Starbuck G R, Lamming G E y Allen W R (1998) Control of luteolysis in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil.* **114**, 201-209.
- Smith T M (1985): Reproduction in South American Camelids. *Iowa State Univ. Vet.* **47**, 110-115.
- Smith C L, Meter A T y Pugh D G (1994): Reproduction in llamas and alpacas: A review. *Theriogenology*. **41**, 573-592.
- Smith B B, Timm K I, Reed P J y Christensen M (2000): Use of cloprostenol as an abortifacient in the llama (*Lama glama*). *Theriogenology*. **41**, 573-592.
- Spies H G, Pau K Y F y Yang S P (1997): Coital and estrogen signals: a contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and rhesus monkey. *Biol. Reprod.* **56**, 310-319.
- Sreenan, J.M. and Beehan, D. 1974. Egg transfer in the cow: Pregnancy rate and egg survival. *J. Reprod. Fert.* **41**, 497-499.
- Srenan J M y Gosling I J (1997): The effect of stage and plasma progesterone level on the induction of multiple ovulation in heifers. *J. reprod. Fertile.* **50**, 367-369.
- Stevens, D H, Burton G J, Sumar J y Nathanielsz P W (1980): Ultrastructural observations on the placenta of the alpaca, *Lama pacos*. *Placenta*. **1**, 21-32.
- Stringfellow D A y Seidel S M (1998): Manual of the international embryo transfer society. Third Edition. International Embryo Transfer Society. Printed the United States of America. 1-169.
- Sumar J, Novoa C y Fernández-Baca S (1972): Fisiología reproductiva post-partum en la alpaca. *Revista de Investigaciones Pecuarias. IVITA UNMSM. Lima-Perú.* pp: 21-27.

- Sumar J y Franco E (1974): Ensayos de transferencia de embriones en camélidos sudamericanos. IN: Informe Final (IVITA) UNMSM, Lima-Perú.
- Sumar J, Smith G W, Mayhua E y Nathnielsz P W (1978): Adrenocortical function in the fetal and newborn alpaca. *Com. Biochem. Physiol.* **59^a**, 79-84
- Sumar J y Leyva V (1981): Colección de semen mediante la vagina artificial en alpaca. *Proceeding of the IVth International Conference on South America Camelids.* Punta Arenas, Chile. pp: 12.
- Sumar J (1983): Studies on reproductive pathology in alpacas. MS Thesis, Department of Obstetrics and Gynaecology, College of Veterinary Medicine, Swedish University of Agriculture and Science, Uppsala. pp: 9-1003.
- Sumar J (1985): Algunos aspectos obstétricos de la alpaca. *Bol. Tec.* 2.
- Sumar J y García M (1986): Fisiología de la reproducción de la alpaca. In: *Nuclear and Related Techniques in Animal Production and Health*, IAEA, Viena. pp: 149-177.
- Sumar J (1988a): Renoval of the ovarios or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Vet. Scand.* **83**, 133-141.
- Sumar J (1988b): Anatomía ultrasónica del aparato genital de la alpaca hembra. XII Reunión Científica Anual APPA. Libro de Resúmenes pp: 65.
- Sumar J y Bravo P W (1991): In situ observation of the ovarian of llamas and alpacas by use of a laparoscopic technique. *J. Anim. Vet. Med. Assoc.* **199**, 1159-1163.
- Sumar J (1993): Efectos de los estímulos de inducción en IA ovulación de alpacas y llamas. *Investigaciones Pecuarias.* Vol. 6 N° 1. pp: 01-07.
- Sumar J, Bravo P W y Foote W C (1993a): Sexual receptivity and time of ovulation in alpacas. *Small Ruminant Research.* **11**, 143-150.
- Sumar J, Alarcón V y Echevarria L (1993b): Niveles de progesterona periférica en alpacas y llamas y su aplicación en el diagnóstico precoz de gestación y otros usos clínicos. *Acta Andina.* **2**, 161-167.

- Sumar J (1994): Effects of various ovulation induction stimuli in alpacas and llamas. *J. Arid Environ.* **26**, 39-45.
- Sumar J (1996): Reproduction in llamas and alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* **42**, 405-415.
- Sumar J (1997): Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. Fisiología en la hembra. Memorias I Simposium Internacional: Avances en Reproducción de Rumiantes. Lima-Perú. pp: 30-36.
- Sumar J y Adams G (1997): Reproductive anatomy and physiology of the female llama. In: Youngquist, R.S. (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia. USA. pp: 792-798.
- Sumar J (1999): Reproduction in female South American domestic camelids. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **54**, 169-178.
- Sumar J (2000): Llamas and alpacas. In: *Reproduction in farm Animals. Seventh Edition*. E.S.E. Hafez, B. Hafez.
- Sumar J (2007): Realidades y mitos en los camélidos sudamericanos. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (APPA) XXX Reunión Asociación peruana de Producción Animal (APPA). V Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. 21-25 Octubre. Memoria. Cuzco-Peru
- Taylor K M, Hungerford D A, Snyder R L y Ulmer F A Jr (1968): Uniformity of karyotypes in the Camelidae. *Cytogenetics.* **7**, 8-15.
- Taylor S., Taylor P J, James A N y Godke R (2000): Successful commercial embryo transfer in the Llama (*Lama glama*). *Theriogenology.* **53**, 1-344.
- Taylor S, Taylor P J, James A N, Denniston R S y Godke R (2001): Alpaca offspring born after cross species embryo transfer to llama recipients. *Theriogenology.* **53**, 1-344.
- Tibary A y Anouassi A (1997): *Theriogenology in camelidae*. Abu Dhabi Printing, Mina, Abu Dhabi, UAE.

- Tibary A y Memon M A (1999): Reproductive physiology in the female South American camelidae. **6**, 217-233.
- Tibary A (2001a): Fertilization, embryo and fetal development in camelids. In: Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology, Vancouver, BC, Canada, 12-15 september. pp: 387-396.
- Tibary A (2001b): Embryo transfer in camelids. In: Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology, Vancouver, BC, Canada, 12-15 september. pp: 407-416.
- Urquieta B y Rojas J R (1988): An introduction to South American camelids. Livestock reproduction in Latin America. In: Proceedings of the Final Research Co-ordination Meeting, Bogota.
- Urquieta B y Rojas R (1990): Studies on the reproductive physiology of the vicuña (*Vicugna vicugna*). Livestock Reproduction in Latin America. IAEA, Vienna. 407-428.
- Van Lennep E (1961): The histology of the placenta of the one humped camel (*Camelus dromedarius*) during the first half of pregnancy. Acta Morph. Neerl. Scand. **4**, 180-193.
- Vaughan J L (2001a): Control of ovarian follicular growth in the alpaca (*Lama pacos*). PhD. Thesis. Central Queensland University.
- Vaughan J L (2001b): Control of follicular waves in alpacas. Rev. Inv. Vet. Perú. Suplem. Lima-Perú. **1**, 112 – 114.
- Vaughan J L, Macmillan K L, Anderson G A y D'Occhio M J (2003): Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. Aust. Vet. J. **81**, 86-90.
- Vaughan J L (2004): Artificial breeding in alpacas. 4th European Symposium on South American Camelids and DECAMA European Seminar, Gottingen, 7 – 9 October, 2004, Germany. Abstracts. Ed. M. Gerken, C. Renieri, M. Gauly and A. Riek.

- Vaughan J L, Macmillan K L y D'Occhio M J (2004): Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science*. pp: 353-361.
- Vaughan J L y Tibary A (2006): Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research*. **61**, 259-281.
- Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Tresguerres J A F, Domínguez V, Ariznavarreta C y Cocero M J (2006): Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Domestic Animal Endocrinology*. **30**, 76-87.
- Velásquez F, Málaga J y Bravo P W (1999): Citología exfoliativa del útero de la alpaca. In: Libro de resúmenes II Congreso Mundial Sobre Camélidos, vol. 84 Cusco-Perú. (abstract).
- Velásquez C y Novoa M C (1999): Superovulación con PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev. Invest. Vet. Perú*. **(1)**, 10.
- Vivanco W, Cárdenas H y Bindon B (1985): Relación entre la duración de la copula y momento de la ovulación en alpacas. Libro de resúmenes V Convención Internacional sobre camélidos sudamericanos. Cusco-Perú. pp: 19.
- Vivanco W (1988): Receptividad sexual y actividad ovárica relacionada con la edad de pubertad en alpaca. Libro de resúmenes V Convención Internacional sobre camélidos sudamericanos. Cusco-Perú. pp: 21.
- Von Baer A, Del Campo MR, Donoso X, Toro F, Von Baer L y Montecinos S (2002): Vitrification and cold storage of llama (*Lama glama*) hatched blastocysts. *Theriogenology*. **57**, 489.
- Von-Kubicek (1979): Samenentnahme beim alpaka durch eine harnohrenfistel. *Z. Tierzucht*. **90**, 335.
- Yagil R y Etzion Z (1984): Enhanced reproduction in camels (*Camelus dromedarius*). *Comp. Biochem. Physiol.* **79**, 201-204.
- Yamamoto M, Ooe M, Fujii C y Suzuki T (1993): Superovulation in cow given a single intramuscular injection of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinyl pyrrolidone, J, Japan. *Vet. Med. Assoc.* **46**, 554-556.

Waldrige B M y Pugh D G (1997): Reproductive techniques in female lamoids. Vet. Med. **92**, 651.

Weeler J C (1995): Evolution and present situation of the South American camelidae. Biol. J. Linn. Soc. **54**, 271-295.

Wiepz W C y Chapman R J (1985): Non-surgical embryo transfer and live birth in a llama. Theriogenology. **24**, 251 - 257.

Wilson Wieps D y Chapman R J (1985): Non- surgical embryo transfer and live birth in a llama. Theriogenology. **24**, 251-257.

Wilson J M, Jones A L, Moore K, Looney C R y Bondioli R R (1993): Superovulation of cattle with a recombiit-DNA bovine follicle stimulating hormone. Anim. Reprod. Sci. **33**, 71-82.