

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRIA EN GANADERIA ANDINA



TESIS

**EFECTO DEL USO DEL GANARELIX EN LA INDUCCION DE LA OVULACION
EN ALPACAS SUPEROVULADAS**

PRESENTADA POR:

OSCAR CONDORI CAHUATA

PARA OPTAR EL GRADO ACADEMICO DE:

MAGISTER SCIENTIAE EN GANADERIA ANDINA

ESPECIALIDAD EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

PUNO, PERU

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRIA EN GANADERIA ANDINA

TESIS



EFFECTO DEL USO DEL GANARELIX EN LA INDUCCION DE LA OVULACION EN ALPACAS SUPEROVULADAS

PRESENTADA POR:

OSCAR CONDORI CAHUATA

PARA OPTAR EL GRADO ACADEMICO DE:

MAGISTER SCIENTIAE EN GANADERIA ANDINA

ESPECIALIDAD EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE DEL JURADO

.....
Dr. LUIS VICENTE OLIVERA MAROCHO

PRIMER MIEMBRO

.....
Dr. NATALIO LUQUE MAMANI

SEGUNDO MIEMBRO

.....
M.sc. PEDRO UBALDO COILA AÑASCO

ASESOR

.....
Mg. JESÚS MARTIN URVIOLA SÁNCHEZ

Puno 28 de diciembre del 2017

ÁREA: Reproducción animal.

TEMA: Efecto del uso de Ganarelix en la inducción de la ovulación en alpacas superovuladas.

LÍNEA: Biotecnología reproductiva.

DEDICATORIA

A mi padre FELIX CONDORI y a mi madre CECILIA CAHUATA por su intenso amor y sacrificio invaluable para mi logro profesional

A mi esposa AMELIA KELI GARCIA por su constante aliento que siempre me brindo durante los estudios de posgrado y ejecución del presente trabajo de investigación.

A mi hijo ZEUS LINDER CONDORI G. y a mi hija SAHORI KAHORI CONDORI G. con la esperanza de que en el mundo en que ellos vivan sea de menos tensión y dolor.

Con cariño a mis amigos y familiares que de una u otra manera apoyaron en el presente trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

- Mi sincero y eterno agradecimiento al Dr. Martin Urviola Sánchez por su acertada dirección en la ejecución del presente trabajo.
- Mi sincero reconocimiento al Dr. Walter Bravo Matheus por la valiosa colaboración y guía en el presente estudio.
- Al Dr. Virgilio Alarcón Bayona (+) Administrador del Centro experimental La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por su invaluable apoyo en la ejecución del presente trabajo.
- A la Sra. Yudy Castañeda por el apoyo en el proceso de ejecución del presente trabajo.
- Al Dr. Julio Enríquez por su valioso apoyo en la parte estadística.
- A los trabajadores y estudiantes del UNSAAC por su valiosa colaboración en la ejecución del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1

**CAPÍTULO I PROBLEMÁTICA DE LA
INVESTIGACIÓN**

1.1	Problema	4
1.2	Objetivos	7

**CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO**

2.1	Control neurocrino de la reproducción	8
	2.1.1. Dinámica folicular	9
	2.1.2. Fisiología de la función ovárica en hembras empadradas que no lograron ovular	12
	2.1.3. Fisiología de la función ovárica de hembras empadradas que no preñaron	16

2.1.4	Ovulación	19
2.1.5.	Actividad luteal	21
2.2	Fisiología ovárica	22
2.2.1.	Control de la dinámica del crecimiento folicular	22
2.2.2.	Inducción de la ovulación	24
2.3	Súper estimulación ovárica	27
2.3.1.	Súper estimulación ovárica en una fase de receptividad sexual	28
2.4	Hormonas utilizadas para inducir la súperovulación en CSA	30
2.4.1.	Hormona folículo estimulante (FSH)	30
2.4.2.	Gonadotropina corionica equina (eCG)	32
2.4.3.	Gonadotropina corionica humana (hCG)	35
2.5	Hormona antagonista de GnRH utilizado en súperovulación	36
2.5.1.	Generalidades	36
2.5.2.	Características químicas del Ganarelix	37
2.5.3.	Mecanismos de acción y receptores	38
2.5.4.	Efectos en la reproducción	41

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1	Ámbito de estudio	42
3.2	Métodos	45
3.2.1.	Periodo de estudio y frecuencia de muestreo	32
3.2.2.	Metodología por objetivo planteado	46
3.2.3.	Variables analizadas	50

3.2.4. Pruebas estadísticas aplicadas	51
---------------------------------------	----

CAPÍTULO IV RESULTADOS

Y DISCUSIÓN

4.1	Determinación de los niveles de FSH sanguíneo por efecto de dos dosis de Ganarelix mediante la prueba de ELISA	52
4.2	Determinación del número de folículos por efecto de dos dosis de Ganarelix mediante ultrasonografía	54
4.3	Evaluación del efecto del tipo de inducción de la ovulación a causa del efecto de dos dosis de Ganarelix	57
	CONCLUSIONES	62
	RECOMENDACIONES	63
	BIBLIOGRAFÍA	64
	ANEXOS	86

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
1. Protocolo experimental	46
2. Variables analizadas	50
3. Niveles de FSH sanguíneo (mIU/ml) en alpacas tratadas con diferentes dosis de Ganarelix	52
4. Dinámica folicular en ambos ovarios por efecto de aplicación de FSH exógeno (eCG) en alpacas tratadas con diferentes dosis de Ganarelix.	54
5. Número de cuerpos luteos por efecto de uso de hormona (hCG) y macho vasectomizado en alpacas tratadas con diferentes dosis de Ganarelix.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
1. Formula estructural del Ganarelix	38
2. Estructura 2D del Ganarelix	38
3. Representación biológica del Ganarelix	38
4. Imagen de un ovario de alpaca por ecografía transrectal	49
5. Ovario mostrando medidas de dos folículos	96
6. Ovario súper estimulado, observamos los folículos súper estimulados	96
7. Observación del ovario súper estimulado	97

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pag.
1. Materiales e insumos utilizados	87
2. Cuadro 4 niveles de FSH sanguíneo con 0.15 mg. de Ganarelix	88
3. Cuadro 5 niveles de FSH sanguíneo con 0.30 mg. de Ganarelix	89
4. Cuadro 7 número de folículos observados en alpacas con 0.15 mg. de Ganarelix	90
5. Cuadro 8 número de folículos observados en alpacas con 0.30 mg. de Ganarelix	92
6. Cuadro 10 número de cuerpos lúteos observados a la ecografía en alpacas tratadas con 0.15 mg. de Ganarelix	94
7. Cuadro 11 número de cuerpos lúteos observados a la ecografía en alpacas tratadas con 0.30 mg. de Ganarelix	95
8. Fotografías de la ecografía de las alpacas tratadas con Ganarelix	96

ABREVIATURAS

GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GnRHa	Antagonista de la hormona liberadora de gonadotropinas
FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
eCG	Gonadotropina corionica equina
hCG	Gonadotropina corionica humana
IU	Unidades internacionales
mIU	Mili unidades internacionales
FGF	Factor de crecimiento fibroblastico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
IGF	Factor de crecimiento semejante a insulina
IGFBP	Proteína transportadora del factor de crecimiento semejante a insulina

RESUMEN

Se utilizaron 40 alpacas hembras huacaya adultas del CICAS La Raya de la UNSAAC del Cusco, para evaluar el efecto de dos niveles de Ganarelix, adaptado al protocolo de súperovulación, sobre (i) los niveles de FSH sanguíneo, (ii) el número de folículos iguales o mayores a 2mm de diámetro y (iii) el tipo de inducción de la ovulación. Se dividió en dos grupos de 20 animales: Gr-A, se administró 0,15mg de Ganarelix y Gr-B se administró 0,30mg de Ganarelix por vía sub cutánea. En el día 0, las muestras sanguíneas fueron colectadas a las 0, 1 y 3 horas post inyección del Ganarelix para determinar los niveles sanguíneos de FSH lo cual se realizó en el laboratorio con la técnica de ELISA. El día 1 se administró 750 UI de eCG por vía intramuscular en ambos grupos, los siguientes 9 días se realizó la evaluación del desarrollo folicular de ambos ovarios mediante ecografía transvaginal cada 24 horas. Para la inducción de la ovulación se aplicó 750 UI de hCG en el día 6 de tratamiento a los sub grupos A1 y B1 de 10 animales respectivamente y el día 8 se utilizó machos vasectomizados en los sub grupos A2 y B2 de 10 animales. Los resultados para los niveles de FSH sanguíneo (mIU/ml) tratadas Ganarelix fueron: Gr-A (0.775 ± 0.190 mIU/ml) y Gr-B (0.774 ± 0.206 mIU/ml); A la evaluación del número de folículos en alpacas tratadas con diferentes dosis de Ganarelix, se reporta en Gr-A: 20.80 ± 7.44 y en Gr-B: 13.90 ± 4.24 , no hay diferencia entre ovarios dentro del grupo. Para el número de cuerpos lúteos por efecto de hCG y macho vasectomizado en alpacas tratadas con diferentes dosis de Ganarelix, se reporta en Gr-A: 4.35 ± 2.75 y en Gr-B 2.52 ± 1.43 por efecto de las dosis de Ganarelix.

Palabras clave: Antagonista, eCG, folículos, FSH y ovulación inducida.

ABSTRACT

We used 40 adult huacaya female alpacas from the CICAS La Raya of the Cusco UNSAAC, to evaluate the effect of two levels of Ganarelix, adapted to the superovulation protocol, on (i) blood FSH levels, (ii) the number of follicles equal or greater than 2mm in diameter and (iii) the type of induction of ovulation. It was divided into two groups of 20 animals: Gr-A, 0.15mg of Ganarelix and Gr-B was administered 0.30mg of Ganarelix subcutaneously. On day 0, blood samples were collected at 0, 1 and 3 hours post injection of Ganarelix to determine blood levels of FSH which was performed in the laboratory with the ELISA technique. On day 1, 750 IU of eCG was administered intramuscularly in both groups, the follicular development of both ovaries was evaluated during the following 9 days by transvaginal ultrasound every 24 hours. For the induction of ovulation, 750 IU of hCG was applied on day 6 of treatment to subgroups A1 and B1 of 10 animals respectively and on day 8 vasectomized males were used in subgroups A2 and B2 of 10 animals. The results for the blood FSH levels (mIU / ml) treated Ganarelix were: Gr-A ($0.775 + 0.190$ mIU / ml) and Gr-B ($0.774 + 0.206$ mIU / ml); To the evaluation of the number of follicles in alpacas treated with different doses of Ganarelix, it is reported in Gr-A: $20.80 + 7.44$ and in Gr-B: $13.90 + 4.24$, there is no difference between ovaries within the group. For the number of corpora lutea due to the effect of hCG and vasectomized male in alpacas treated with different doses of Ganarelix, it is reported in Gr-A: $4.35 + 2.75$ and in Gr-B $2.52 + 1.43$ due to the dose of Ganarelix.

Keywords: Antagonist, eCG, follicles, FSH & induced ovulation.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de la población de alpacas y llamas en el país se cría en rebaños pequeños, de composición heterogénea, que incluyen animales de diferentes colores y de razas. En estas condiciones los diferentes recursos genéticos se encuentran sub utilizados, su potencial productivo que podría ser mejorado mediante selección se ve muy limitado. Para superar estas limitaciones varias instituciones están trabajando en la formación de núcleos genéticos de alpacas y llamas “puras” y, con base en estos animales preseleccionados, avanzar en el mejoramiento genético mediante selección de animales que reúnen características deseables desde el punto de vista productivo. El objetivo es lograr que la ganancia genética acumulada en dichos núcleos, sea transmitida a los rebaños de los productores en forma de vientres y reproductores mejorados (Sumar 1997).

Mientras dichos esfuerzos se van materializando y ampliando, se necesita desarrollar técnicas reproductivas que faciliten la difusión masiva de dichos animales mejorados. En la actualidad, el número promedio de crías ($n=6$) que una alpaca hembra o llama puede producir durante toda su vida reproductiva es muy limitado para difundir el material genético deseado. Las técnicas de la ovulación múltiple (OM) y transferencia de embriones (TE) son una posibilidad para superar esta limitación; permitirían, por otro lado, reducir el intervalo generacional mediante el uso de animales jóvenes (Novoa y Sumar 1968).

Los estudios sobre OM y TE en alpacas y llamas son escasos. Para estimular el crecimiento folicular se ha utilizado la gonadotropina corionica equina (eCG) o la hormona estimulante del crecimiento folicular (FSH) y luego para inducir la ovulación múltiple se ha empleado ya se la gonadotropina corionica humana

(hCG), la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o la monta natural. Estos tratamientos han sido aplicados ya sea en fase folicular (Novoa y Sumar 1968; Palomino *et al.* 1987; Bravo *et al.* 1995c) o en fase progestacional inducida (Bourke *et al.*, 1992; 1994; Correa *et al.*, 1994). En general los tratamientos indicados, tanto en fase folicular como progestacional, resultaron en una respuesta ovulatoria variable, el número de ovulaciones varió entre 2 a 11. En aquellos ensayos en que se usó monta natural para inducir la súperovulación, la respuesta fue nula o baja, comparada con aquella en que se usó hCG o GnRH. Velásquez y Novoa (1999) probaron el uso de 1000 UI de eCG seguida de 1000 UI de hCG, tanto en fase folicular como progestacional inducida, obteniendo 8.2 ± 2.6 y 17.8 ± 8.3 ovulaciones, respectivamente ($P < 0.05$); sin embargo, la respuesta ovárica fue excesiva, particularmente en la fase progestacional, lo que determinó que el ovario quede atrapado en la bolsa ovárica.

En otra investigación de Novoa *et al.*, (1999) probaron tres dosis para superovular en alpacas, usando dosis de 750 UI de eCG con 750 UI de hCG; otra dosis 500 UI eCG con 750 UI hCG y dosis de 750 UI eCG con 1000 UI hCG, obteniendo 6.8 ± 2.6 ; 6.0 ± 2.8 y 12.6 ± 1.8 ovulaciones respectivamente.

En reproducción animal, las primeras experiencias realizadas con antagonistas de GnRH en ganado ovino para inhibir el crecimiento folicular y desencadenar la aparición controlada de una nueva onda de crecimiento (Brebion, 1990), se basaron en el uso de dosis diarias durante los 11 días que se mantiene el tratamiento de sincronización de ciclos, previo al inicio del tratamiento de súperovulación con FSH. Estos trabajos mostraron mejores resultados en cuanto al número de embriones viables pero su aplicación práctica se vio

condicionada por factores limitantes económicos, de manejo y de variabilidad en la respuesta.

Posteriormente, fue su uso para eliminar la secreción endógena pulsátil de LH y retrasar el pico preovulatorio de LH, consiguiendo así prolongar la fase folicular y mejorar la calidad tanto de los folículos como de los oocitos (Oussaid *et al.*, 2000)

La administración por vía subcutánea del antagonista de GnRH teverelix, en dosis únicas (1,5 y 3,0 mg), podría ser útil en la inducción de este efecto, ya que su uso evitó la presencia de folículos de gran tamaño (López, 2004). Esta acción estaría causada por la capacidad de los antagonistas para actuar sobre los receptores hipofisarios de GnRH que, por bloqueo competitivo, provocan una inhibición de la secreción de hormona luteinizante (Coccia *et al.*, 2004).

El estudio tuvo como objetivos: 1) Determinación de los niveles de FSH sanguíneo por efecto de dos dosis de Ganarelix mediante la prueba de ELISA. 2) Determinación del número de folículos por efecto de dos dosis de Ganarelix mediante ultrasonografía. 3) Evaluación del efecto del tipo de inducción de la ovulación a causa del efecto de dos dosis de Ganarelix.

CAPÍTULO I

PROBLEMÁTICA DE INVESTIGACIÓN

1.1. PROBLEMA

En camélidos sudamericanos, como en otras especies, las técnicas de superovulación, conservación y transferencia de embriones constituyen en la actualidad una herramienta imprescindible tanto para el desarrollo de programas de conservación de recursos genéticos en razas con bajo número de efectivos, como para la aplicación de programas de mejora genética destinados a incrementar las producciones ganaderas.

En ambos casos, el objetivo de los protocolos de superovulación es el incremento de descendientes de las hembras seleccionadas mediante el aumento del número de ovulaciones y de embriones viables en respuesta a la utilización de tratamientos hormonales. Éstos incluyen generalmente la administración de un tratamiento con gonadotropinas (que permite el crecimiento de un mayor número de folículos) durante los últimos días del tratamiento de sincronización del celo y la administración de progestágenos intravaginales para sincronizar la ovulación. (Lopez, 2004)

Sin embargo, y a pesar de las mejoras conseguidas durante los últimos años en cuanto a la eficacia de los protocolos de superovulación, los rendimientos de estas técnicas presentan una gran variabilidad; no sólo entre los diferentes

grupos de tratamiento, sino también entre animales de un mismo grupo. Han sido diversos los estudios que se han llevado a cabo para averiguar las causas de esta variabilidad (factores limitantes) y poder así, en base a estos conocimientos, optimizar los protocolos utilizados. (Lopez, 2004)

Las hembras camélidas no expuestas al macho, desarrollan ondas foliculares sucesivas, en tres fases de desarrollo, para lo cual un grupo de folículos son reclutados, de ellos es seleccionado uno e inicia su crecimiento, diferenciándose y alcanzando el tamaño ovulatorio (igual o mayor a 7mm de diámetro); mientras que los demás regresionan (Bravo *et al*, 1990; Fernández, 1993). Igualmente la lactación parece tener efecto, pues en llamas no lactantes el diámetro (12mm) es mayor que en las lactantes (10mm) (Bravo, 1997). El folículo dominante parece controlar su duración (Adams, 2001); puesto que si no hay ovulación se atresia; reconociéndose un nuevo folículo 2 a 3 días después de la primera disminución de tamaño del folículo dominante (Bravo *et al*, 1990). Una vez que los folículos primordiales comienzan a diferenciarse, es decir abandonan la población de folículos de reserva tienen dos caminos posibles a seguir: ovular o atresarse en algún punto de su diferenciación. Alrededor del 99% de los folículos que comienzan la activación se atresian sin llegar nunca a ovular. El proceso de atresia puede ocurrir en cualquier momento de la foliculogénesis (Gigli *et al*, 2006). Con respecto al largo de la onda folicular en camélidos sudamericanos, se determinó un promedio total de 13,8 días (Bravo *et al*, 1990)

Existen trabajos que refieren que a mayor tiempo de duración de la cópula se obtiene mayor porcentaje de alpacas que ovulan, sin embargo se ha encontrado que en varios casos hembras con más de 20 minutos no llegan a

ovular mientras que otras con 5 minutos si lo hacen (Novoa, 1989). Existen fallas ovulatorias post cópula, que no han sido totalmente explicadas, señalándose que podría ser atribuida a una sensibilidad disminuida de los folículos a los niveles circulantes de LH debido a las variaciones en los estadios de maduración folicular (Fernandez, 1993).

La problemática encontrada tras las revisiones de artículos de investigación sobre la súperovulación en camélidos sudamericanos (alpacas) está relacionado con la interacción del eje hipotálamo – hipófisis tras la utilización de hormonas exógenas las que conllevan a una pobre producción y desarrollo de folículos de Graf que llegan a ovular para ser fertilizados en un proceso de producción de embriones.

Mucho falta por hacer para aplicar tecnologías reproductivas en estas especies, pero existe la gran ventaja de un amplio conocimiento en otras especies domésticas y que pueden ser adaptadas en un corto período de tiempo. No sólo la aplicación de modernas técnicas de reproducción asistida (inseminación artificial, transferencia embrionaria, fertilización in vitro, transgénesis, clonación, etc.) servirá para el mejoramiento genético de los camélidos sudamericanos domésticos, sino también podrán ser muy útiles para la conservación de las especies silvestres y la variabilidad genética de las mismas (Huanca *et al*, 2007).

Uno de los objetivos de un programa de manejo reproductivo en un establecimiento ganadero está orientado a obtener óptimos parámetros reproductivos, entre ellos una reducción de la edad al primer servicio, edad al primer parto, intervalo parto primer servicio, intervalo parto concepción, intervalo entre partos, número de servicios por concepción, porcentaje de

mortalidad y aumentar las tasas de fertilidad y natalidad, buscando obtener una máxima eficiencia para garantizar el éxito de programas de mejora genética y retorno económico.

La utilización de los antagonistas de GnRH en la reproducción asistida está siendo muy bien utilizada en el ser humano para la realización de tratamientos de infertilidad; en los animales domésticos hay trabajos de investigación realizados principalmente en ovinos de razas europeas de ciclo estrual estacionario, lográndose una buena producción de embriones de excelente calidad. También hay trabajos en vacunos, caprinos con el mismo objetivo que realizados en ovinos.

Al tener buena respuesta el antagonista de GnRH en otras especies es por lo que se plantea en este perfil de investigación la utilización de antagonista de GnRH en un protocolo de superovulación en alpacas para poder evaluar su eficacia en el desarrollo de folículos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Determinar el efecto de dos niveles del Ganarelix y el tipo de inducción de superovulación en alpacas.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinación de los niveles de FSH sanguíneo por efecto de dos dosis de Ganarelix mediante la prueba de ELISA.
- Determinación del número de folículos por efecto de dos dosis de Ganarelix mediante ultrasonografía.
- Evaluación del efecto del tipo de inducción de la ovulación a causa del efecto de dos dosis de Ganarelix.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. CONTROL NEUROCRINO DE LA REPRODUCCIÓN

Las funciones reproductoras en las hembras se encuentran bajo el control de una compleja interacción entre hormonas hipotalámicas, hipofisarias y gonadales. El hipotálamo está considerado como un órgano final de integración de las informaciones del encéfalo, produce neurosecreciones, y con ayuda de hormonas liberadoras e inhibidoras de la liberación, gobierna la secreción de las hormonas adenohipofisarias, entre las que se encuentran las hormonas gonadotróficas, FSH y LH (Hafez *et al.*, 2002; Arthur *et al.*, 1991).

La GnRH regula la secreción y liberación de las gonadotropinas hipofisarias para el control de la actividad ovárica, incluyendo la secreción de hormonas esteroides y no esteroides y ovulación. Se ha encontrado en muchas especies que la eminencia media contiene la mayor cantidad de GnRH, y es considerada el área en la cual el péptido es almacenado en las terminaciones neuronales, anterior a la liberación hacia la sangre portal hipofisial (Clarke, 1987).

La liberación de forma pulsátil de la GnRH en el hipotálamo estimula la liberación de FSH y LH de la hipófisis, tal es así que, la estimulación coital provoca un reflejo neuro-endocrino que activa el centro de la GnRH, liberándose la oleada preovulatoria de LH (Arthur *et al.*, 1991).

2.1.1. Dinámica folicular

En los animales domésticos, los primeros folículos antrales aparecen durante el periodo prepuberal; sin embargo el desarrollo folicular completo sólo se observa cuando FSH y LH han alcanzado los perfiles de la hembra adulta; así, la FSH estimula la mitosis de las células de la granulosa y la formación del líquido folicular mientras que la LH actúa sobre las células de la teca para producir testosterona que pasa a la granulosa para transformarse en estradiol 17b (Hafez, 1996).

En el desarrollo de folículos dominantes pequeños, además de gonadotropinas, interviene la regulación paracrina de los factores FGF (factor de crecimiento fibroblástico), EGF (factor de crecimiento epidérmico) y el IGF (factor de crecimiento semejante a insulina) con influencia directa en el desarrollo folicular al promover la proliferación de las células de la granulosa (Monniaux *et al.*, 1997). Es así que la IGF-1 cumple un rol fundamental en el reclutamiento y la selección del folículo dominante, lo que favorece al aumentar la aromatización inducida por la FSH en las células de la granulosa, que lleva al aumento paulatino de estradiol en el folículo dominante (Steinkampf *et al.*, 1998).

Monniaux *et al.* (1997) sugieren que el desarrollo de folículos dominantes terminales es dependiente de gonadotropinas, caracterizado por un incremento en la sensibilidad a la FSH, lo que probablemente resulta de un sistema intrafolicular que involucra al estradiol y a los IGFs.

Por lo mencionado anteriormente, las concentraciones de IGFs se incrementan marcadamente en folículos grandes durante su desarrollo terminal, debido a que se considera que sólo folículos maduros, con

concentraciones altas de estradiol e IGFs, serán capaces de desarrollarse frente a concentraciones bajas de FSH; asimismo, concentraciones altas de inhibina en el folículo dominante pueden incrementar el estímulo de la LH a la producción androgénica por células de la teca, contribuyendo con un aumento de la síntesis de estradiol por las células de la granulosa, que tiene como consecuencia, la maduración sostenida de dicho folículo (Monniaux *et al.*, 1997).

Anderson (1997) demostró que factores de crecimiento folicular contrarrestarían a factores que inhiben el crecimiento de la célula y que promueven la apoptosis. Así el IGF-1 inhibiría la apoptosis en células de la granulosa de folículos dominantes tempranos y preovulatorios (Chun *et al.*, 1996); mientras que la IGFBP-3, que tiene un efecto antagonista a la FSH, inhibiría a la IGF-1. (Ling *et al.*, 1993). Sin embargo, las gonadotropinas actuarían inhibiendo la apoptosis en células de la granulosa al reducir la expresión de la IGFBPs e incrementar la expresión de la IGF-I (Hammond *et al.*, 1991).

En los camélidos sudamericanos, a diferencia de los animales de ovulación espontánea, se observa el desarrollo de ondas foliculares cíclicas, relacionado con el crecimiento, maduración y atresia del folículo dominante (Bravo y Sumar, 1989). En llamas, la onda folicular dura entre 11 y 12 días donde los folículos tardan en promedio 4 (3-5) días para alcanzar el tamaño ovulatorio, otros 4 días (2-8) manteniéndose del mismo tamaño y luego 4 días (3-5 días) donde se atresian y disminuyen su tamaño (Bravo *et al.*, 1990b), similares resultados se han reportado en alpacas (Bravo y Sumar, 1989); sin embargo Aza *et al.* (2000) mencionan un largo de onda folicular

de 22 días. Por otro lado, la duración del intervalo entre ondas es de 20 y 15 días en llamas no preñadas y preñadas respectivamente (Adams *et al.*, 1990a), mientras que Aba *et al.* (2000) reportan un intervalo interonda de 18 días. En alpacas Vaughan *et al.* (2000), encontraron que la duración del intervalo interondas depende del tamaño del folículo dominante al momento de la cópula, siendo el promedio de 15.8 – 0.6 días.

Las ondas foliculares se dan de manera alternada en ambos ovarios en un 81 % (Bravo *et al.*, 1990b); en donde uno de los ovarios presenta folículos de tamaño ovulatorio mientras que en el otro van creciendo otros folículos que rápidamente adquirirán el tamaño ovulatorio cuando en el anterior se vuelvan atrésicos, explicándose con esto, los largos periodos de aceptación de la hembra frente al macho (Bravo y Sumar, 1985). La receptividad se observa cuando el folículo tiene diámetro = 6mm (Bravo y Sumar, 1989).

El crecimiento del folículo dominante (> 6mm) está relacionado con la regresión de los folículos subordinados, estando la inhibina relacionada con la inhibición de los folículos pequeños (Adams *et al.*, 1990a; Bravo *et al.*, 1990b). Si no ocurre cópula el folículo dominante se atresia y el nuevo folículo dominante puede ser reconocido 2 a 3 días después de que se da el descenso de tamaño del folículo dominante presente inicialmente (Bravo *et al.*, 1990b). Sin embargo, después de la cópula, de la ovulación y de la formación del cuerpo lúteo, se produce la emergencia de una nueva onda folicular, con presencia de un folículo dominante que no llega a ovular y posteriormente regresa (Araínga, 2002). A partir del día 8 post monta los niveles de estradiol empiezan a elevarse alcanzando su pico (11 ± 2 pmol/L)

entre los días 11 y 13 en llamas, lo que estaría relacionado con la presencia de un folículo preovulatorio en este periodo (Aba *et al.*, 1995).

2.1.2. Fisiología de la función ovárica en hembras empadradas que no lograron ovular.

La ecografía ovárica realizada en hembras adultas de las diferentes especies de camélidos, llamas (Adams *et al.*, 1989), alpacas (Vaughan *et al.*, 2004) y vicuñas (Agüero *et al.*, 2001; Miragaya *et al.*, 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 *et al.*, 1989; 1990; Agüero *et al.*, 2001, Miragaya *et al.*, 2004; Vaughan *et al.*, 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 *et al.*, 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).

La velocidad de crecimiento folicular varía en las diferentes especies de camélidos siendo 0,5–0,8 mm/día en llamas (Adams *et al*, 1989; 1990), 0,43 mm/día en alpacas (Vaughan *et al*, 2004) y 1,8 mm/día en vicuñas (Agüero *et al*, 2001; Miragaya *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 2000).

Algunos autores observaron que los folículos dominantes se distribuyen de forma homogénea entre ambos ovarios (Adams *et al*, 1992b; Bourke *et al*, 1992b; Bravo *et al*, 1990b; 1995a; 1995c, Bravo y Sumar, 1989; Fernández Baca *et al*, 1970b; San Martín *et al*, 1968; Vaughan *et al*, 2003), pero otros

indican que el número de folículos presentes en el ovario izquierdo es ligeramente superior al del derecho (Del Campo *et al*, 1996a). No obstante, no siempre se produce alternancia entre ambos ovarios de una oleada a otra (Adams *et al*, 1990; Bourke *et al*, 1992b; Vaughan *et al*, 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 *et al*, 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, 2001a) y en ocasiones se puede producir la coexistencia de dos folículos dominantes, uno en crecimiento y otro en regresión (Adams *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 2004), 18 días en llamas (Adams *et al*,

1990; Chávez *et al*, 2002) y 4 días en vicuñas (Agüero *et al*, 2001; Miragaya *et al*, 2004). No obstante, Bravo y Sumar (1989) y Bravo *et al* (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 *et al*, 2004) y de 9 a 16 mm en llamas (Adams *et al*, 1990). Esto podría explicar parcialmente las diferencias observadas entre ambas especies en la duración del intervalo entre dos oleadas consecutivas (Vaughan *et al*, 2004; Adams *et al*, 1990). No obstante, no explica el corto intervalo entre oleadas observado en las vicuñas (Miragaya *et al*, 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 *et al*, 1993), y que los folículos hemorrágicos, con un diámetro superior a los 13 mm, se mantienen en el ovario 25 días o más (Adams *et al*, 1991b).

2.1.3. Fisiología de la función ovárica de hembras empadradas que no preñaron.

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 *et al*, 1969; Fernández-Baca *et al*, 1970a; León *et al*, 1990; Rodríguez, 1959; San Martín *et al*, 1968). La elevación de los niveles de estradiol asociada al crecimiento folicular no es suficiente para provocar la descarga preovulatoria de LH (Bravo *et al*, 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 *et al*, 1970; Bravo *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 1970a) y recientemente, con la presencia en el semen de un factor inductor de la ovulación (Adams y Ratto, 2001; Chen *et al*, 1985). En un estudio realizado por Fernández-Baca *et al* (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 *et al*, 1995; 1999; Bravo *et al*, 1990a; 1991b; Bravo *et al*, 1992).

La descarga de LH como respuesta a la cópula está condicionada por el tamaño del folículo dominante (Bravo *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 1990), cuando el diámetro folicular es menor o el folículo se encuentra en regresión, no se produce la ovulación (Bravo *et al*, 1991b).

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 *et al*, 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 *et al* (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 *et al*, 2001; San Martín *et al*, 1968). Adams *et al* (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 *et al*, 1990; Sumar *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 1993; 1995c; Fernández-Baca *et al*, 1970a; 1973). En estas especies las ovulaciones múltiples son muy raras y su frecuencia está comprendida entre el 5 y 15% (Bravo *et al*, 1993; Fernández-Baca *et al*, 1970a).

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 *et al*, 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 *et al*. 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 *et al*, 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 *et al*, 1995a; Chaves *et al*, 2002; Ratto *et al*, 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 *et al*, 1994; Tibary y Memon, 1999)

2.1.4. Ovulación

La ovulación en animales domésticos ocurre en respuesta múltiples mecanismos y factores fisiológicos, como la posible acción de prostaglandinas estimulando las contracciones ováricas y activando fibroblastos tecales los que liberan enzimas proteolíticas que digieren la pared folicular y la lámina basal del ovario (Hafez, 1996). Murdoch (1995), reporta que cuando se acerca el momento de la ovulación, se produce un incremento progresivo de las células apoptósicas en la superficie del ovario,

túnica albugínea y pared apical del folículo, que junto a los otros factores neuroendocrinos terminarían por producir la ovulación.

En los camélidos sudamericanos la ovulación depende del estímulo coital y ocurre 26 horas post cópula en alpacas (San Martín *et al*, 1968; Fernández Baca *et al*, 1970b) ó 24-30 horas después de la inyección de LH (1 mg), GnRH (4-8 ug) y hCG (500-700 UI) por inducción artificial (Aller *et al.*, 1999; Huanca *et al.*, 2001; Sumar, 1981; Sumar, 1993; Fernández Baca *et al.*, 1970b).

Una proporción variable de hembras (10-20%) no llega a ovular en respuesta a uno o más servicios, ya sea con macho entero o vasectomizado; es probable que estas fallas ovulatorias se deban a variaciones en el estadio de desarrollo folicular (Novoa, 1992). Por el contrario estudios hechos por Sumar *et al.* (1987a) demuestran que contactos ligeros entre machos y hembras, junto a estímulos visuales, olfatorios y auditivos pueden ser responsables de supuestos casos de ovulación espontánea, siendo alta la incidencia (42%) en el apogeo de la estación sexual de Diciembre a Marzo. Estudios posteriores hechos por Adams *et al.* (1990a) en llamas reportaron un 9 a 15 % de ovulación espontánea.

Se ha estudiado la relación entre duración de la cópula y momento de la ovulación determinándose que hembras con mayor duración de cópula (> 15 minutos) son las que presentan mayores porcentajes de ovulación (Vivanco *et al.*, 1985).

Ríos *et al.* (1985), colocaron semen completo de alpaca en el fornix vaginal de hembras receptoras, lo cual indujo la ovulación en 53% de ellas; luego obtuvo 66% de ovulación al colocar semen del toro también sobre el fornix

vaginal de hembras alpacas; resultados que indicarían que el semen de alpaca y del toro tendrían un factor de inducción de la ovulación.

Estas observaciones y otras más, nos indican que estímulos diferentes resultan también en diferentes niveles de respuesta, en relación al número de hembras que ovulan (Fernández Baca *et al.*, 1970b; Sumar, 1993).

La ovulación se produce por el estímulo nervioso que se produce en la vagina durante la cópula, el cual va al hipotálamo para liberar la GnRH que actúa sobre la adenohipófisis estimulando la secreción de LH (Fernández Baca *et al.*, 1970b). Se ha observado un significativo incremento de concentraciones de LH plasmática, quince minutos después de iniciada la cópula en llamas, con el pico preovulatorio de LH a las 2 horas post coito (3-8ng/ml) volviendo a niveles basales (0.96ng/ml) 7 horas post cópula; mientras que niveles de estradiol 17 β se mantuvieron iguales a las 18 horas post servicio, declinando a las 22 horas y cayendo significativamente a las 48 horas post cópula (Bravo *et al.*, 1990a).

2.1.5. 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 *et al.*, 1989; 1990; 1991a; Sumar y Bravo, 1991), observándose una elevación de los niveles de progesterona entre 4 y 6 días después del coito (Aba *et al.*, 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 *et al.*, 1995a; Adams *et al.*, 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 *et al*, 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 *et al*, 1989; 1990; 1992b; Fernández-Baca *et al*, 1970a; Sumar y Bravo, 1991; Sumar *et al*, 1988a). Cuando no existe gestación, las hembras vuelven a mostrar receptividad sexual 12 a 14 días después de la última cópula.

2.2. FISIOLÓGÍA OVÁRICA

2.2.1. 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:

- Asegurar la presencia de un folículo preovulatorio en el momento de la monta o de la inseminación artificial.
- Asegurarnos de que un tratamiento superovulatorio se inicia durante el comienzo de una oleada de crecimiento folicular y en ausencia de un folículo dominante.

- 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 *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 2002). Mientras que el tratamiento durante 9 días con esponjas intravaginales impregnadas con diferentes cantidades de acetato de medroxiprogesterona produjo resultados variables (Aba *et al*, 1999b; Ferrer *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 2003). No obstante, este método es invasivo, puede provocar hemorragias y no resulta de fácil aplicación en condiciones de campo.

2.2.2. 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 Gonadotropina 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 *et al*, 1968; Fernández-Baca *et al*, 1970a; Bourke *et al*, 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 *et al*, 1968; England *et al*, 1969; Fernández Baca *et al*, 1970a; Adán *et al*, 1989; Bourke *et al*, 1992b; 1995a; Bravo *et al*, 1992). Sin embargo, para que esta hormona sea capaz de inducir la ovulación es necesario utilizar concentraciones superiores a los 1000 μg (Bravo *et al*, 1992, Huanca *et al*, 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 *et al*, 1992b; 1995a). La ovulación se produce generalmente a las 26 h de la inyección de hCG (San Martín *et al*, 1968; Novoa, 1970) y a las 28 h de la aplicación de GnRH (Bourke *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 1997), mientras que otros indican que son necesarios 1000 μg (Bravo *et al*, 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 *et al*, 1991).

La estimulación mecánica de la vagina y el cérvix no induce la ovulación en los camellos, los dromedarios y las alpacas (Bravo *et al*, 2000), Posteriormente se ha comprobado que la inyección intramuscular de plasma seminal provoca la ovulación en llamas y alpacas (Sumar *et al*, 1986; Adams *et al*, 2001). En base a los resultados se puede señalar que la administración intramuscular de plasma seminal de llama, alpaca y en menor grado de toro, induce la ovulación en las llamas hembras y favorece la formación de un cuerpo lúteo de características propias de la especie (López *et al*, 2006). Chen *et al*. (1985) reportan la ocurrencia de ovulación en camellos bactrianos al depositar semen del camello en la Vagina en ausencia de la cópula. Igualmente, Ríos (1989) Menciona similares resultados en camélidos sudamericanos y sugiere la presencia de un factor presente en el plasma seminal de alpacas que es capaz de inducir la ovulación. Ello ha llevado a la identificación de una proteína, denominada factor inductor de la ovulación, presente en el semen de los camélidos. Según Pan *et al*. (2001), este factor es común en camellos bactrianos y en el toro, y su composición química difiere de la forma nativa de LHRH, LH, HCG, PMSG y PGF, y es semejante a la actividad del GnRH, el cual estimula la liberación de LH y FSH de la pituitaria induciendo la ovulación.

Sin embargo, no existen estudios concluyentes que reporten la inducción de la ovulación con plasma seminal de camélidos sudamericanos.

2.3. SÚPER ESTIMULACIÓN OVARICA

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 a tener en cuenta al aplicar estos tratamientos:

- Estas especies no presentan fases luteales espontáneas.
- 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 *et al*, 1995a; Monniaux *et al*, 1983).

En un estudio realizado por Velásquez *et al* (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 *et al*, 1992). Estos factores, así como el efecto de los tratamientos sobre el transporte de gametos, no han sido evaluados en los camélidos sudamericanos.

2.3.1. Súper estimulación ovárica 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 *et al*, 1997; Ratto *et al*, 1997, Velásquez y Novoa, 1999; Huanca *et al*, 1999).

Correa *et al* (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 *et al*, 1997). Por su parte, Ratto *et al*, (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 *et al* (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 *et al*, 1999a). Este hecho podría indicar que la progesterona endógena aumenta la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario, favoreciendo la secreción de gonadotropinas (Leyva *et al*, 1999).

Novoa *et al* (1999) indican que las dosis de eCG entre 500 y 750 UI y de hCG de 750 UI, son las apropiadas para inducir la ovulación múltiple en alpacas, tanto en cantidad como en consistencia suficiente para cosechar y difundir material genético deseado.

2.4. HORMONAS UTILIZADAS PARA INDUCIR LA SÚPEROVULACIÓN EN CAMELIDOS SUDAMERICANOS (CSA)

2.4.1. FSH.

La hormona estimulante del folículo (también llamada hormona folículo-estimulante, abreviada como FSH) es una hormona gonadotropina sintetizada y secretada por las células gonadotropas en la glándula pituitaria anterior. La FSH regula el desarrollo, el crecimiento, la maduración en la pubertad y los procesos reproductivos del cuerpo. La FSH y la hormona luteinizante (LH) actúan de forma sinérgica en la reproducción. (Perez, G.)

La FSH es una hormona glucoproteica cuyo peso molecular es de 37.300 Daltons (Grimek *et al*, 1979). Está compuesta por dos subunidades, una subunidad α que es estructuralmente similar a la LH que contiene 92 aminoácidos y una subunidad β que contiene 118 aminoácidos, 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 provoca que su vida media sea muy corta, aproximadamente de 110 minutos (Moor *et al*, 1984), lo que obliga a realizar aplicaciones repetidas para conseguir una buena estimulación ovárica.

El gen de la subunidad alfa de la FSH se encuentra en el cromosoma 6p21.1-23. Se expresa en diferentes tipos de células. El gen de la subunidad beta se encuentra en el cromosoma 11p13, y se expresa en las células gonadotropas de la pituitaria, controlada por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), inhibida por la inhibina y potenciada por la activina. (Perez, G.)

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 *et al*, 1983), las cuales presentan receptores específicos para esta hormona.

Al igual que sucede en la LH, la liberación de FSH en la glándula pituitaria está controlada por pulsos de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Estos pulsos, a su vez, están sujetos a la retroalimentación de estrógeno desde las gónadas.

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 camélidos 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 *et al*, 1988b)

2.4.2. Gonadotropina corionica equina (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.

La Gonadotropina coriónica equina (eCG, PMSG), hormona placentaria, es secretada en las copas endometriales que se han formado alrededor del día 40 en las yeguas gestantes; es una hormona glicoproteica con un peso molecular aproximadamente de 70.000 Daltons, por lo que no aparece en la orina y circula en la sangre; (Hafez, 2002; Sumano, 2006; Hincapié, 2005)

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 *et al*, 1978). 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 *et al*, 1978). Esto permite inducir la respuesta superovulatoria con una única administración, habiéndose demostrado que las administraciones múltiples no mejoran la tasa de ovulación (Hafez, 2002).

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.

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 *et al*, 1982a).

La eCG administrada algunas horas previas a la ovulación estimula el crecimiento folicular debido a que tiene la capacidad de unirse e incrementar el número de receptores de FSH y LH de los folículos, aumentando el tamaño del folículo preovulatorio, incrementando las concentraciones plasmáticas de progesterona luego de la ovulación, mejorando así el

desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez. (Bó *et al*, 2009; De los Reyes, 2011)

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 *et al*, 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 *et al*, 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 *et al*, 2006a).

La dosis de eCG más 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 *et al*, 1999). El empleo de dosis superiores determina un considerable incremento de la frecuencia de aparición de folículos quísticos (Bravo *et al*, 1995c).

2.4.3. Gonadotropina corionica humana

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glicoproteica producida en el embarazo, fabricada por el embrión en desarrollo poco después de la concepción y más tarde por el sinciotrofoblasto (parte de la placenta). Su función es evitar la desintegración del cuerpo lúteo del ovario y, por ende, mantener la producción de progesterona que es fundamental para el embarazo en los seres humanos (Perez, G.)

Debido a su similitud con la hormona luteinizante (LH), la hCG también puede usarse clínicamente para inducir la ovulación en los ovarios.

La hCG es una glicoproteína compuesta de 244 aminoácidos, con un peso molecular de 36,7 kDa. Sus dimensiones totales son de 75×35×30 angstroms (7,5×3,5×3 nanómetros). Es heterodimérica, con una subunidad β (beta) que es única para la hCG, y con una subunidad α (alfa) idéntica a la de la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo-estimulante (FSH), y la hormona estimulante del tiroides (TSH). La subunidad α (alfa) tiene 92 aminoácidos de largo y unas dimensiones de 60×25×15 angstroms (6×2,5×1,5 nm). La subunidad β de la hCG contiene 145 aminoácidos y unas dimensiones de 6,5×2,5×2 nm, codificados mediante seis genes muy homólogos que están dispuestos en tándem y en pares invertidos en el cromosoma 19q 13.3 – CGB. Las dos subunidades crean un pequeño núcleo hidrófobo rodeado por una gran superficie con una proporción área volumen 2,8 veces mayor que la de una esfera. La gran mayoría de los aminoácidos exteriores son hidrófilos (Perez, 2017).

2.5. HORMONA ANTAGONISTA DE GnRH UTILIZADA EN INDUCCIÓN DE SÚPEROVULACIÓN

2.5.1. Generalidades

El descubrimiento por parte de Schally y Guillermin en 1990 de la secuencia de aminoácidos de este decapeptido, permitió el desarrollo de compuestos con acción agonista o antagonista de GnRH. En un principio se pensó que la obtención de estos compuestos sintéticos no representaría un gran problema ya que bastaría con la sustitución de uno o dos aminoácidos de la cadena proteica, pero fueron más de 30 años de experimentación los que llevaron a la síntesis de compuestos con un perfil farmacocinético, de seguridad y comercial aceptables. Los diferentes intentos realizados hasta llegar a los análogos hoy disponibles perseguían fundamentalmente la síntesis de compuestos con mayor actividad, sin efectos secundarios y capaces de permanecer más tiempo en el organismo. En el caso de los antagonistas se sucedieron tres generaciones de compuestos hasta llegar a los actualmente comercializados como cetrorelix, iturelix, azaline B, ganirelix, abarelix y antarelix (Huirne y Lambalk, 2001), ya que los primeros compuestos sintetizados (primera y segunda generación de antagonistas), presentaban el inconveniente de producir reacciones anafilácticas importantes debidas a la liberación de histamina (Coccia *et al.* 2004).

Los agonistas de GnRH han demostrado, a lo largo de la experiencia clínica, tener un perfil de efectos secundarios considerablemente aceptable y una eficacia probada. Las dosis utilizadas en protocolos de asistencia a la reproducción en la especie humana son menores que las requeridas en el caso de los antagonistas, pero el inicio de su acción requiere al menos 7-14

h. Además, su mecanismo de acción todavía presenta lagunas, lo que ha ido desplazando su uso a favor de los antagonistas de GnRH (Conn y Crowley, 1994).

Ganirelix es un competitivo inyectable hormona liberadora de gonadotropina antagonista (GnRH antagonista). Se utiliza sobre todo en la reproducción asistida para controlar la ovulación. El fármaco actúa bloqueando la acción de la GnRH en la pituitaria, así rápidamente la supresión de la producción y la acción de LH y FSH. Ganirelix se utiliza en el tratamiento de fertilidad para prevenir la ovulación prematura que podría resultar en la cosecha de los huevos que son demasiado inmaduros para ser utilizado en procedimientos tales como la fertilización in vitro. (Kim *et al.* 2015)

2.5.2. Características químicas del Ganarelix

Ganirelix Acetate para inyección (ganirelix) es un decapeptido sintético con alta actividad antagonista contra de origen natural liberadora de gonadotropina hormona (GnRH). Ganirelix Acetate se deriva de GnRH nativa con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3, 6, 8, y 10 para formar la siguiente fórmula molecular del péptido ($C_{80} H_{113} ClN_{18} O_{13}$): N-acetil-3- (2-naftil) -D- alanil-4-cloro-Dphenylalanyl-3- (3-piridil) -D-alanil-L-seril-L-tirosil-N⁹, N¹⁰-dietil-D-homoarginilo-L-leucylN⁹, N¹⁰-dietil- L-homoarginilo-L-prolil-D-alanilamida de etilo. El peso molecular para Ganirelix Acetate es 1570.347 g / mol como una base libre anhidra. (rxlist.com)

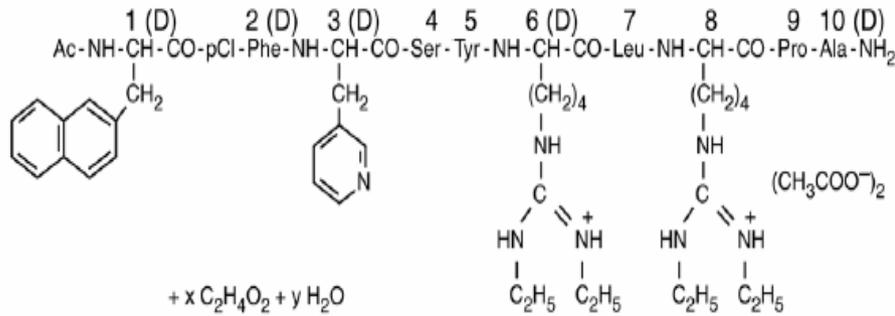


Figura 1. La fórmula estructural del Ganarelix

Fuente: rxlist.com

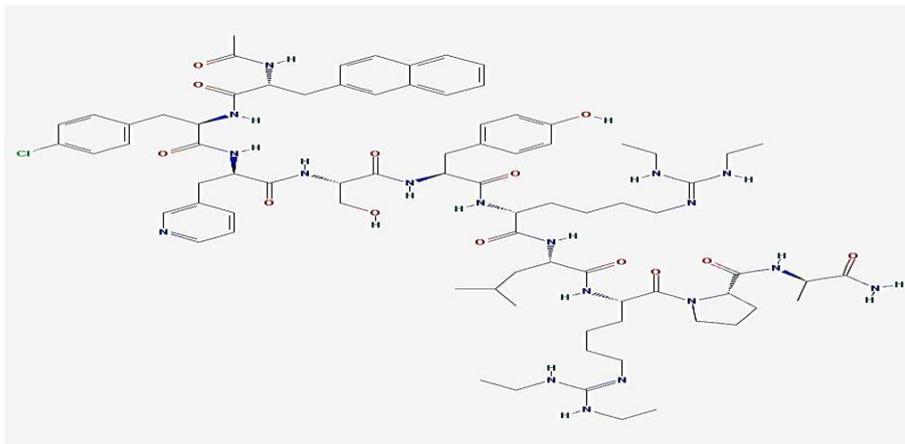


Figura 2. Estructura 2D del Ganarelix

Fuente: Kim *et al.* 2015

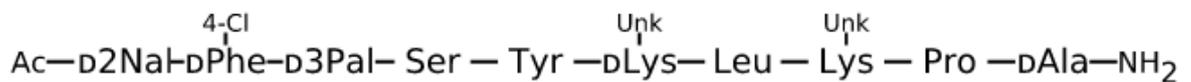


Figura 3. Representación biológica del Ganarelix

Fuente: Kim *et al.* 2015

2.5.3. Mecanismos de acción y receptores

El principal mecanismo de acción de los antagonistas de GnRH (GnRHa) es el bloqueo competitivo de los receptores de GnRH. A diferencia de lo que sucede con los agonistas, los GnRHa no producen estimulación inicial de la liberación de gonadotropinas sino una supresión inmediata y reversible de la producción de FSH y LH, de duración e intensidad dosis dependiente y

completamente reversible en 24-72 h al conservar la adenohipófisis su capacidad de respuesta frente al estímulo de la GnRH. Entre las 4 y 24 h posteriores a la administración del antagonista (6 h como media), se observa una disminución en la concentración de FSH en plasma del 30% y del 70%, en el caso de la LH. (Huirne y Lambalk, 2001).

Los antagonistas producen un bloqueo competitivo de los receptores de GnRH en la membrana celular de las células gonadotróficas. Los antagonistas de GnRH modulan el eje hipotálamo hipofisario por bloqueo competitivo de los receptores de GnRH en la hipófisis. Como consecuencia, se logra una supresión rápida, profunda y reversible de las gonadotrofinas endógenas sin la estimulación inicial inducida por los agonistas de GnRH. (Geller, 2001)

Los antagonistas de la GnRH son más complejos que los agonistas y actúan mediante un mecanismo completamente diferente para inhibir la secreción de las gonadotrofinas. Se unen competitivamente a los receptores de la GnRH, lo cual evita la acción de los pulsos endógenos de GnRH sobre la hipófisis. La secreción de gonadotrofinas disminuye dentro de las horas de la administración de los antagonistas y no se produce un efecto de exacerbación. La interrupción del tratamiento con los antagonistas de la GnRH produce una recuperación rápida y predecible del eje hipofiso-gonadal, ya que el sistema de receptores de la hipófisis permanece intacto. (Sociedad iberoamericana de información científica)

Son fármacos que se emplean con la finalidad de evitar la luteinización precoz folicular y controlar el momento de la ovulación, para que no se produzca de forma prematura. Produce los siguientes efectos:

- Bloquea los receptores de GnRH al unirse a ellos, impidiendo que la GnRH se pueda unir a los receptores de la GnRH (bloqueo competitivo). Los receptores de la GnRH están situados en la superficie de las células gonadotróficas de la hipófisis.
- Reprime la síntesis de gonadotropinas (FSH y LH) por parte de la hipófisis al bloquear los receptores de la GnRH.
- Es de acción inmediata.

El ganirelix y el cetorelix. Ambos compuestos parecen suprimir las gonadotropinas y son eficaces dentro de las 4-8 horas de su administración. La mediana de la vida media terminal de 0.25 mg del cetorelix es de 5 horas después de una dosis única y de 20 horas luego de dosis múltiples. La vida media de eliminación del ganirelix después de dosis múltiples de 0.25 mg es de 13 horas. (Sociedad iberoamericana de información científica)

Luego de la administración subcutánea única de 0.25 mg de ganirelix, los niveles séricos aumentan rápidamente y logran un pico plasmático de 15 ng/ml en 1 a 2 horas. La vida media es de 13 horas con un clearance de 2.4 l/h. El 75% se excreta por heces y el 25% por orina. La farmacocinética luego de dosis múltiple subcutánea fue similar a la de la dosis única. (Geller, 2001)

Las ventajas de la utilización de este fármaco en ciclos de reproducción asistida son las siguientes:

- Se produce la supresión inmediata de los niveles séricos de LH, impidiendo la ovulación prematura.
- La duración del tratamiento de estimulación de la ovulación es menor.

- Suele ser bien tolerado por la mujer, con pocos efectos secundarios, ya que la estimulación no es muy agresiva.
- Se administra una menor dosis de FSH.
- Disminuye la frecuencia del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).
- La recuperación de la función hipofisaria de la mujer es rápida, de forma que no afecta a que se puedan producir nuevas estimulaciones en ciclos posteriores.
- No causa quistes foliculares, al no ocasionar el efecto flare up que se origina en los agonistas de la GnRH.

Las desventajas de la utilización son las siguientes:

- El uso de antagonistas de GnRH presenta pocos inconvenientes ya que, al ser una estimulación no demasiado agresiva, es tolerado por la mayoría de las mujeres sin prácticamente contraindicaciones.
- El único problema que existe es que la tasa de embarazo es ligeramente inferior (entre el 3% y el 5% menor) a la obtenida en protocolos de estimulación ovárica donde se utilizan los análogos de GnRH debido al efecto de los antagonistas sobre el endometrio, las trompas de Falopio, el folículo y el ovocito. (De-renis *et al.* 2014)

2.5.4. Efectos en la reproducción

Si bien los resultados han mejorado notablemente en los últimos años, existen aún limitaciones que se han relacionado con el estatus folicular, el número y la distribución por tamaño de los folículos en el momento de iniciar el tratamiento con FSH. La población folicular idónea para responder al tratamiento de superovulación (máximo número posible de pequeños

folículos sensibles a las gonadotropinas sin presencia de folículos dominantes) podría ser inducida mediante la administración de fármacos antagonistas de GnRH.

En reproducción animal, las primeras experiencias realizadas con antagonistas de GnRH en ganado ovino para inhibir el crecimiento folicular y desencadenar la aparición controlada de una nueva onda de crecimiento (Brebion, 1990), se basaron en el uso de dosis diarias durante los 11 días que se mantiene el tratamiento de sincronización de ciclos, previo al inicio del tratamiento de superovulación con FSH. Estos trabajos mostraron mejores resultados en cuanto al número de embriones viables pero su aplicación práctica se vio condicionada por factores limitantes económicos, de manejo y de variabilidad en la respuesta.

Posteriormente, fue su uso para eliminar la secreción endógena pulsátil de LH y retrasar el pico preovulatorio de LH, consiguiendo así prolongar la fase folicular y mejorar la calidad tanto de los folículos como de los oocitos (Oussaid *et al.* 2000).

En pequeños rumiantes, los protocolos de superovulación que incorporan la administración de GnRHa de tercera generación son recientes (Cognie, 1999) y han aportado resultados preliminares prometedores. En cabras, la administración de teverelix (0,5 mg/día, durante 11 días a partir del 2º día post administración del progestágeno intravaginal) puso de manifiesto el potencial papel de estos fármacos en las nuevas técnicas de reproducción; la inhibición de la actividad hipofisaria se reflejó en una clara disminución de las concentraciones plasmáticas de FSH y LH y, como consecuencia de ello, se multiplicó por dos el número de folículos de pequeño tamaño

impidiéndose el crecimiento de folículos dominantes (González-Bulnes *et al.* 2004c). Sin embargo, en ganado caprino, el número de embriones viables obtenidos cuando se administra un tratamiento de superovulación con posterioridad al uso de un antagonista de GnRH es bajo (Cognie *et al.* 2003). Esto podría deberse a la fuerte disminución en el crecimiento de folículos hasta los estadios intermedios -folículo dependiente de gonadotropinas causada por el aporte de GnRH_a (González-Bulnes *et al.* 2004c), a pesar de que la función hipofisaria se recupera al suspender la administración del antagonista (González-Bulnes *et al.* 2004b).

Para disminuir los inconvenientes derivados del manejo de los animales, Alabart *et al.* (2001) han realizado diversas experiencias en ovejas sobre tratamientos clásicos de superovulación (progestágeno intravaginal, 14 días; pFSH i.m., dos veces al día durante 4 días y pLH i.v. junto con las dos últimas dosis de pFSH) en los que han incorporado la administración de antagonistas de GnRH en regímenes de dosis múltiples y dobles y han valorado su eficacia en la tasa y calidad de los embriones recuperados, después de monta natural ó IA a los 8 días de la retirada del tratamiento con progestágenos. La administración subcutánea de 11 dosis de teverelix (0,5 mg, cada 24 h, comenzando el día de la administración del progestágeno) ofrecía un bloqueo prácticamente completo de la secreción de LH hipofisaria. Sin embargo, con el tratamiento de dosis doble (0,5 mg de teverelix, separados 6 días, comenzando el mismo día de la administración intravaginal de progestágenos), se mantenían concentraciones plasmáticas significativas de LH, por lo que se cree que este régimen no sería válido y se

necesitarían nuevos estudios para poder establecer un régimen de dosificación óptimo y sencillo.

La administración subcutánea de dosis únicas (1,5 y 3,0 mg) del antagonista de GnRH teverelix ejerce un efecto dosis-dependiente sobre la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, disminuyendo los niveles plasmáticos medios e inhibiendo la pulsatilidad de LH durante al menos las 48 h posteriores a su administración. La acción ejercida por el antagonista de GnRH sobre la secreción de LH inhibe el efecto de dominancia folicular y permite un aumento significativo del número de folículos gonadotropo-receptivos de pequeño tamaño (2-3 mm), alcanzándose el efecto máximo alrededor del tercer día tras el tratamiento; sin embargo, estos folículos secretan menor cantidad de inhibina A, en los animales tratados con la dosis más alta (3,0 mg). Los folículos gonadotropo-receptivos obtenidos después de la administración de una única dosis de 1,5 mg de antagonista de GnRH, tres días antes de la administración de un protocolo de superovulación, son capaces de crecer hasta tamaños preovulatorios en respuesta a la administración de FSH exógena. (Lopez 2004)

En la Universidad de Edimburgo, se ha probado la alternativa de administración subcutánea de una única dosis elevada (22 mg) de GnRH α . Los resultados mostraron que esta dosis producía la deprivación hipofisaria completa por un período aproximado de dos meses (Souza *et al.* 2000), lo que daba lugar a la desaparición total de los folículos dominantes y a un fuerte incremento de la población de folículos gonadotropo-dependientes (González-Bulnes *et al.*, 2003c).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en el Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicado en el distrito de Marangani, provincia de Canchis, departamento del Cusco, entre las coordenadas 14°28'41" latitud sur y 71° 02' 78" longitud oeste y una altitud de 4235 m.s.n.m. predominando pastos naturales que corresponden a puna húmeda.

El análisis de las muestras sanguíneas se realizó en laboratorio de Fisiología de la Escuela profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco ubicado en el distrito de Marangani, provincia de Canchis, departamento de Cusco. Ubicado a una altitud de 3 698 msnm. Entre las coordenadas Latitud sur: 14°21'24" y Longitud oeste: 71°10'09".

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Periodo de estudio y frecuencia de muestreo

El presente trabajo se realizó durante los meses de enero a marzo del 2016, para lo cual de un rebaño de 500 alpacas huacayas hembras, se seleccionaron 40 animales de 3 y 4 años de edad los cuales fueron divididos en dos grupos de 20 alpacas. Se les administró, por vía subcutánea, una

dosis única de 0.15 mg (Grupo A) y la dosis de 0.30 mg (Grupo B) de Ganarelix (Orgalutran®), en 0.5 ml de solución acuosa. Para lo cual se adaptó el protocolo de superovulación de Novoa *et al.* (1999) en donde utilizo eCG y hCG; se adicionó el efecto inductor del macho vasectomizado.

El comportamiento farmacodinámico de Ganarelix se estudió en base a las respuestas hipofisaria y ovárica a la administración del fármaco.

Cuadro1. Protocolo experimental

Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Ecografía / 24 horas										
Aplicación de 0.15 y 0.30 mg de Ganarelix / SC	Aplicación de eCG en dosis 750 UI/IM					Inducción de la ovulación con hCG en dosis 750 UI/IM		Inducción de la ovulación con macho vasectomizado		

Fuente: Adaptado de Novoa *et al.* 1999

3.2.2. Metodología por objetivo planteado

3.2.2.1. Determinación de los niveles de FSH sanguíneo por efecto de dos dosis de Ganarelix mediante la prueba de ELISA.

Para la determinación de posibles cambios en el perfil de secreción pulsátil de FSH a nivel sanguíneo por efecto del antagonista de GnRH. Se procedió a la realización de la siguiente metodología:

- Los animales seleccionados fueron enumerados en forma correlativa para su identificación, utilizándose una pintura roja para su marcación en ambos lados de la alpaca.
- A los dos grupos de tratamiento se les evaluó el status ovárico para determinar los animales que presentaban folículos primarios menores a 2 mm mediante ecografía.
- Se procedió a la inyección sub cutánea de las dosis únicas de 0.15 mg y 0.30 mg de ganarelix (Orgalutran®) a las alpacas que presentaron folículos ≤ 2 mm (día 0).
- Se realizó la toma de muestras de 10 ml de sangre a cada alpaca las cuales fueron extraídas de la vena yugular mediante la utilización de tubos heparinizados al vacío (Vacutainer®). Para lo cual se tomaron las muestras seriadas, a las 0, 1 y 3 horas post-inyección. Los tubos se identificaron con el número del animal y hora de toma de la muestra sanguínea.
- Todas las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min.
- Se almacenó el plasma en tubos de poliestireno cerrados e indentificados con el número del animal y hora de muestreo, los que permanecieron en un congelador a -20°C hasta el momento del análisis.
- Los niveles de gonadotropinas (FSH) fueron medidos en laboratorio por duplicado en alícuotas de 200 μl de plasma según las técnicas de análisis Inmunoensayo enzimático con doble anticuerpo descritas por

Diagnostic Automation, Inc., respectivamente. El límite de detección fue de 2.5 mIU/ml. para FSH.

3.2.2.2. Determinación del número de folículos por efecto de dos dosis de Ganarelix mediante ultrasonografía.

El procedimiento para lograr obtener los datos necesarios que indiquen el efecto del antagonista en el desarrollo folicular es el siguiente:

- Los animales seleccionados fueron enumerados en forma correlativa para su identificación, utilizándose una pintura roja para su marcación en ambos lados de la alpaca.
- El día 1 (Cuadro 1) se aplicó una dosis única de 750 UI de eCG (Folligon®) vía intramuscular.
- Para la determinación del efecto del fármaco sobre la dinámica de crecimiento y la actividad de la población folicular se llevó a cabo mediante un estudio de los ovarios por ecografías transrectales, cada 24 h desde el Día 1 hasta el día 9.
- Una vez localizado el ovario (Figura 4) se determinó el diámetro de todos los folículos mayores o iguales a 2 mm. A partir de la observación realizada, se anotó el número de folículos del ovario en el que se señalaba el tamaño de los folículos identificados.

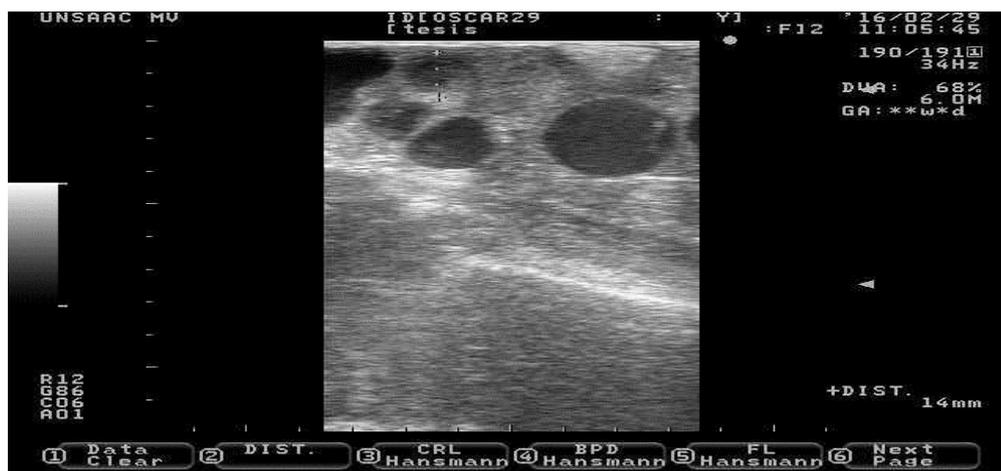


Figura 4. Imagen de un ovario de alpaca mediante ecografía transrectal (diámetros del folículo aparecen señalados entre cruces)

3.2.2.3. Evaluación del efecto del tipo de inducción de la ovulación a causa del efecto de dos dosis de Ganarelix.

La metodología planteada para la obtención de los datos requeridos para poder evaluar la interacción del tipo de inducción con la dosis de antagonista de GnRH es como sigue:

- Los animales seleccionados fueron enumerados en forma correlativa para su identificación, utilizándose una pintura roja para su marcación en ambos lados de la alpaca.
- En el grupo A (0.15 mg ganarelix) y grupo B (0.30 mg ganarelix) se dividió cada uno en dos subgrupos de 10 alpacas, sub grupo A1 y sub grupo B1 recibieron 750 UI de hCG (Pregnyl®) y Sub grupo A2 y sub grupo B2 fueron sometidos con macho vasectomizado para la inducción de la ovulación.
- Para comprobar que la ovulación fue efectiva se siguió observando los ovarios mediante la ecografía como se indica en el cuadro 1.
- La presencia de cuerpos lúteos indicaban que se produjo la inducción de la ovulación.

- Se anotó el número de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios

3.2.3. VARIABLES ANALIZADAS

Las variables que se tuvieron en cuenta se detallan en el siguiente tabla:

Cuadro 2. Variables analizadas

Factor	Variables	Tipo	Indicador	Descripción
Crecimiento	aGnRH	Independiente	mg	Hormona que antagoniza la secreción de GnRH para el desarrollo folicular del ovario
	Folículo	Dependiente	número	Nos indica la cantidad obtenida tras la aplicación de hormonas de súperovulación.
Ovulación	HCG	independiente	mg	Hormona de induce la ovulación
	Cuerpo lúteo	Dependiente	número	Nos va indicar la cantidad de ovulaciones obtenidas tras la inducción.

3.2.4. PRUEBAS ESTADÍSTICAS APLICADAS

Los datos obtenidos fueron transformados a valores diagonales para su análisis:

Objetivo 1: Se utilizó un diseño bloque completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2; donde el factor A fue hora con tres niveles (0 hrs, 1 hora, 3 horas) y el factor B fue la dosis con 2 niveles (0.15 mg y 0.30 mg), se bloqueó por animal teniendo 40 animales los cuales recibieron la combinación de los factores mencionados.

Objetivo 2: Se utilizó un Diseño Completo al Azar con sub muestreos donde los tratamientos fueron 2 (dosis 0.15 mg y 0.30 mg) y se consideró sub muestreo a cada ovario (izquierdo y derecho), para la determinación de la dinámica folicular.

Objetivo 3: Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 (hormona y macho) x 2 (dosis 0.15 y 0.30) y sub muestreos (ovario izquierdo y derecho), para la determinación del efecto inductor de ovulación.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE FSH SANGUÍNEO POR EFECTO DE DOS DOSIS DE GANARELIX MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA.

Los niveles de FSH sanguíneo en el Gr-A (0.775 ± 0.190 mIU/ml) fue similar al Gr-B (0.774 ± 0.206 mIU/ml) (cuadro 3, cuadro 4 y cuadro 5).

Cuadro 3. Niveles de FSH sanguíneo (mIU/ml) en alpacas tratadas con diferentes dosis de Ganarelix

Tratamientos	hora	N	Promedio \pm D.E.	Promedio \pm D.E.
Gr-A Ganarelix 0.15 mg.	0	20	0.752 ± 0.206	$0.775 \pm 0.190a$
	1	20	0.792 ± 0.192	
	3	20	0.783 ± 0.179	
Gr-B Ganarelix 0.30 mg.	0	20	0.778 ± 0.209	$0.774 \pm 0.206a$
	1	20	0.768 ± 0.200	
	3	20	0.776 ± 0.218	

Todas las hembras de ambos grupos (Gr-A y Gr-B) exhibieron una disminución de los niveles de FSH después de la aplicación del Ganarelix considerando que los niveles sanguíneos normales de las alpacas es de 5.76 mIU/ml en alpacas que copularon y 5.64 mIU/ml en la que no copularon (Bravo *et al.* 1991), el presente resultado indica que el antagonista de GnRH origino la disminución de

la concentraciones séricas de FSH en la sangre, actuando en el bloqueo competitivo de los receptores de GnRH generando una supresión inmediata y reversible de la producción de la FSH y LH (Huirne y Lambalk, 2001).

La ocurrencia de la disminución de la concentración de FSH a las 0 horas tanto en el grupo A (0.752 ± 0.206) y grupo B (0.778 ± 0.209) es comparable a los reportes de Lopez (2004) en ovinos tratados con Teverelix con dosis de 1.5 mg (4.8 ± 0.23 mIU/ml) y con 3.0 mg (5.52 ± 0.24 mIU/ml)

Los resultados del presente estudio (Gr-A: 0.752 y Gr-B: 0.778) como los reportados por otros autores en ovinos, sugieren y corroboran que la ocurrencia de la disminución/ supresión de los niveles de FSH en el torrente sanguíneo son inmediatos tras la aplicación del Ganarelix, en el presente estudio no hubo seguimiento de las concentraciones del FSH en los días posteriores; por lo tanto no se pudo determinar hasta qué día siguió el efecto del antagonista; sin embargo podríamos inferir en base a estudios de concentración de gonadotropinas post aplicación de un antagonista en llamas (Silva *et al.* 2011) a las 8 horas continuo el efecto supresor; en ovinos (Lopez, 2004) en un tiempo de 72 días, que las alpacas tratadas siguieron con el efecto antagonista hasta las 72 horas post aplicación pero con menor intensidad de acción sobre los receptores hipofisarios de la GnRH, esto comparando con los números de folículos ubicados en los ovarios observados por ecografía (anexo 4 y anexo 5) donde los ovarios mostraron incremento en número y tamaño folicular.

La no diferencia de acción (0.775 ± 0.190 y 0.774 ± 0.206) de las dos dosis (0.15 mg y 0.30 mg) de antagonista respectivamente son concordantes con lo encontrado en ovinos (Lopez, 2014), debido a que el antagonista suprime

inmediatamente la producción de las gonadotropinas en duración e intensidad de dosis dependiente (Huirne y Lambalk, 2001).

4.2. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE FOLÍCULOS POR EFECTO DE DOS DOSIS DE GANARELIX MEDIANTE ULTRASONOGRAFIA.

Hubo diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) en el desarrollo folicular en Gr-A (20.80 ± 7.44) que en Gr-B (13.90 ± 4.24) por efecto de las dosis de Ganarelix, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ovarios dentro del grupo.

Cuadro 6. Dinámica folicular en ambos ovarios por efecto de aplicación de FSH exógeno (eCG) en alpacas tratadas con diferentes dosis de Ganarelix.

Tratamientos	ovario	N	Promedio \pm D.E.	Promedio \pm D.E.
Gr-A Ganarelix 0.15 mg.	derecho	20	21.95 ± 7.38	$20.80 \pm 7.44a$
	izquierdo	20	19.65 ± 7.52	
Gr-B Ganarelix 0.30 mg.	derecho	20	13.60 ± 3.63	$13.90 \pm 4.24b$
	izquierdo	20	14.20 ± 4.85	

La superestimulación ovárica consiste en inducir el crecimiento, maduración y ovulación de un gran número de folículos de manera simultánea con la aplicación de hormonas de acción estimulante del crecimiento folicular con efectos a nivel de las células de la granulosa, los camélidos al ser especies que no presentan fases luteales espontáneas, y tener fases foliculares continuas y prolongadas hacen que la estimulación hormonal sea variable e inconstante.

En la investigación realizada, todas las hembras de ambos grupos (Gr-A y Gr-B) exhibieron en ambos ovarios incremento de folículos en número y desarrollo (mm) después de ser tratadas con FSH exógena (eCG) (cuadro 6 y anexo 4 y

anexo 5), de acuerdo a los hallazgos de Novoa *et al.* (1999), Huanca *et al.* (1999), Ratto *et al.* (2005) y Huanca *et al.* (2006a).

La ocurrencia de mayor número de folículos en alpacas tratadas con 0.15 mg. de Ganarelix (20.80 ± 7.44) que aquellas tratadas con 0.30 mg de Ganarelix (13.90 ± 4.24) es comparable a lo reportado por Lopez (2004) en ovinos tratados con dosis de 1.5 mg (17.2 ± 0.8) y con dosis de 3.0 mg (11.4 ± 0.6); pero siendo superiores a los reportes en alpacas de Correa *et al.* (1994) que utilizó eCG dosis única (1500 UI) obteniendo 22 folículos en 4 alpacas; Huanca *et al.* (1999) que aplicaron dos tratamientos en etapa receptiva, T1 (día 0: 750 UI hCG y días 8,9 y 10: 300 UI eCG) con 2.3 ± 1.9 (OD) y 1.7 ± 1.5 (OI) y el T2 (días 8,9 y 10: 300 UI eCG) con 4.4 ± 2.5 (OD) y 3.8 ± 3.1 (OI); Huanca *et al.* (2006a) reporta en alpacas con uso de eCG 7.5 ± 1.2 ; Mendoza *et al.* (2012) utiliza dos tratamientos, T1: (200 mg FSH en dosis decrecientes por 4 días/ 12 horas) obtuvo 6.50 ± 2.76 y el T2: (700 UI eCG dosis única) obtuvo 10.20 ± 4.47 ; Murillo (2012), utilizando T1=400 UI y T2=500 UI de eCG, más 100 ug de GnRH, y 0.262 mg prostaglandina F2 α (clorprostenol) en alpacas, obtuvo T1= 4.66, T2=5.0 folículos preovulatorios \geq a 7 mm; Ancco (2013), evaluó la respuesta ovárica a dos dosis superovulatorias de eCG en alpacas Suri en fase luteal, en época de empadre: T1=400 UI y T2=500 UI de eCG, más 100 ug de GnRH, y 0.262 mg prostaglandina F2 α (clorprostenol), cuyos resultados para T1= 5.83 ± 2.04 , T2= 4.33 ± 1.51 folículos preovulatorios \geq a 7 mm.

La ocurrencia del desarrollo de folículos pequeños hasta folículos pre ovulatorios, se debe a que la eCG estimula la mitosis de las células de la granulosa y la formación del líquido folicular (Hafez, 1996), además interviene la regulación paracrina de los factores FGF (factor de crecimiento fibroblástico),

EGF (factor de crecimiento epidérmico) y el IGF (factor de crecimiento semejante a insulina) con influencia directa en el desarrollo folicular al promover la proliferación de las células de la granulosa (Monniaux *et al.*, 1997). Es así que la IGF-1 cumple un rol fundamental en el reclutamiento y la selección del folículo dominante, lo que favorece al aumentar la aromatización inducida por la FSH en las células de la granulosa, que lleva al aumento paulatino de estradiol en el folículo dominante (Steinkampf *et al.*, 1998).

Monniaux *et al.* (1997) sugieren que el desarrollo de folículos dominantes terminales es dependiente de gonadotropinas, caracterizado por un incremento en la sensibilidad a la FSH, lo que probablemente resulta de un sistema intrafolicular que involucra al estradiol y a los IGFs.

Por lo mencionado anteriormente, las concentraciones de IGFs se incrementan marcadamente en folículos grandes durante su desarrollo terminal, debido a que se considera que sólo folículos maduros, con concentraciones altas de estradiol e IGFs, serán capaces de desarrollarse frente a concentraciones bajas de FSH; asimismo, concentraciones altas de inhibina en el folículo dominante pueden incrementar el estímulo de la LH a la producción androgénica por células de la teca, contribuyendo con un aumento de la síntesis de estradiol por las células de la granulosa, que tiene como consecuencia, la maduración sostenida de dicho folículo (Monniaux *et al.*, 1997).

Anderson (1997) demostró que factores de crecimiento folicular contrarrestarían a factores que inhiben el crecimiento de la célula y que promueven la apoptosis. Así el IGF-1 inhibiría la apoptosis en células de la granulosa de folículos dominantes tempranos y preovulatorios (Chun *et al.*,

1996); mientras que la IGFBP-3, que tiene un efecto antagonista a la FSH, inhibiría a la IGF-1. (Ling *et al.*, 1993). Sin embargo, las gonadotropinas actuarían inhibiendo la apoptosis en células de la granulosa al reducir la expresión de la IGFBPs e incrementar la expresión de la IGF-I (Hammond *et al.*, 1991).

Los resultados del presente estudio (Gr-A: 20.8 y Gr-B: 13.9) como los reportados por otros autores en alpacas, sugieren y corroboran que la ocurrencia de la acción de la estimulación ovárica del desarrollo folicular es mayor cuando se aplica la eCG, cuando los folículos están en la etapa de reclutamiento, al aplicar el Ganarelix previo al protocolo de superovulación se consigue poblaciones foliculares idóneas con ausencia de folículo dominante. Estos resultados demuestran que la administración por vía subcutánea del Ganarelix, en dosis únicas (0.15 y 0.30 mg), podría ser útil en la inducción de este efecto ya que su uso evita la presencia de folículos dominantes. Si bien es cierto que existe diferencias estadísticas entre los dos grupos tratados con antagonista (Gr-A y Gr-B), esta diferencia estaría causada por la capacidad del Ganarelix de actuar sobre los receptores hipofisarios de GnRH que, por bloqueo competitivo, provocan una inhibición de la secreción de gonadotropinas (Coccia, 2004) y por el tiempo de acción en los receptores hipofisarios, ya que la dosis (0.15 mg) realizaría un menor tiempo de bloqueo de los receptores hipofisarios frente a la dosis (0.30 mg) lo que supondría que el grupo A (0.15 mg) empezó anticipadamente la secreción de FSH endógena, con llevando a mayor reclutación de folículos primordiales y continuando con el mayor desarrollo folicular hasta la presencia de 20.80 ± 7.44 folículos preovulatorios que el grupo B (0.30 mg) 13.90 ± 4.24 .

4.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIPO DE INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN A CAUSA DEL EFECTO DE DOS DOSIS DE GANARELIX.

Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la inducción de la ovulación en Gr-A (4.35 ± 2.75) que en Gr-B (2.52 ± 1.43) por efecto de las dosis de Ganarelix, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los inductores de la ovulación dentro del grupo.

Cuadro 9. Número de cuerpos lúteos por efecto de uso de hormona (hCG) y macho vasectomizado en alpacas tratadas con diferentes dosis de Ganarelix

Tratamientos	inductor	N	Promedio \pm D.E.	Promedio \pm D.E.
Gr-A	hormona	20	5.35 ± 3.29	$4.35 \pm 2.75a$
Ganarelix 0.15 mg.	macho	20	3.35 ± 1.59	
Gr-B	hormona	20	2.45 ± 1.60	$2.52 \pm 1.43b$
Ganarelix 0.30 mg.	macho	20	2.60 ± 1.27	

Para la inducción de la ovulación en alpacas se recurre a la administración de hormonas con actividad de LH. La más común utilizada es la hCG en dosis de 750 UI (Bourke *et al.*, 1995a; Huanca *et al.* 1999; Novoa *et al.* 1999).

La ocurrencia de mayor número de ovulaciones en alpacas tratadas con 0.15 mg. de Ganarelix (4.35 ± 2.75) que aquellas tratadas con 0.30 mg de Ganarelix (2.52 ± 1.43), ambos datos obtenidos son mayores a lo reportado por Quispe (2015) utiliza dos tratamientos diferentes T1 (0.33 g P4, 1.0 mg BE, 250 UI eCG, 50 ug GnRH) y T2 (0.33 g P4, 1.0 mg BE, 500 UI eCG, 50 ug GnRH) halló en cuerpos luteos T1= 1.0 ± 1.4 y T2 = 1.2 ± 2.7 ; y menores a lo reportado por Correa *et al.* (1997) encuentran 7.3 ± 3.1 en un tratamiento con uso de pFSH en dosis decrecientes; Ratto *et al.* (1997) utiliza multiples dosis decrecientes (200 mg) de pFSH repartido en 5 dias hallando 13.8 ± 2.7 ; Velasquez *et al.* (1999) que reportan 8.2 ± 2.3 cuerpos luteos al utilizar 1000 UI

eCG (día 0) con 1000 UI hCG (día 6); Novoa *et al.* (1999) indican que con dosis 750 UI eCG (día 0) más 750 UI hCG (día 5) hallaron 6.8 ± 2.6 cuerpos luteos; Huanca *et al.* (1999) que aplicaron dos tratamientos en etapa receptiva, T1 (día 11: 750 UI hCG) con 4.1 ± 1.7 (OD) y 3.6 ± 2.1 (OI) y el T2 (días 8,9 y 10: 300 UI eCG) con 2.0 ± 2.2 (OD) y 1.6 ± 1.7 (OI); Mendoza *et al.* (2012) utiliza dos tratamientos, T1: (200 mg FSH en dosis decrecientes por 4 días/ 12 horas) obtuvo 3.75 ± 2.55 y el T2: (700 UI eCG dosis única) obtuvo 8.00 ± 3.42 ; Murillo (2012), utilizando T1=400 UI y T2=500 UI de eCG, más 100 ug de GnRH, y 0.262 mg prostaglandina F2 α (clorprostenol) en alpacas, obtuvo en ambos tratamientos 3 cuerpos luteos; Ancco (2013), evaluó la respuesta ovárica a dos dosis superovulatorias de eCG en alpacas Suri en fase luteal, en época de empadre: T1=400 UI y T2=500 UI de eCG, más 100 ug de GnRH, y 0.262 mg prostaglandina F2 α (clorprostenol), cuyos resultados para T1= 4.83 ± 2.48 y T2= 3.60 ± 1.14 .

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 *et al.*, 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 *et al.* 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 *et al.*, 1990a).

La ovulación ocurre en respuesta múltiples mecanismos y factores fisiológicos, como la posible acción de prostaglandinas estimulando las contracciones ováricas y activando fibroblastos tecales los que liberan enzimas proteolíticas

que digieren la pared folicular y la lámina basal del ovario (Hafez, 1996). Murdoch (1995), reporta que cuando se acerca el momento de la ovulación, se produce un incremento progresivo de las células apoptósicas en la superficie del ovario, túnica albugínea y pared apical del folículo, que junto a los otros factores neuroendocrinos terminarían por producir la ovulación.

La prostaglandina F contribuye a la ruptura de los lisosomas de las células epiteliales en el ápice folicular. Sus aumentos también incrementan las contracciones de las células musculares lisas del estroma y de la teca externa de los folículos preovulatorios, ricamente innervados por terminaciones del sistema nervioso autónomo. Las contracciones ováricas facilitan la ruptura folicular e intervienen en la expulsión del ovocito. (Savio *et al.* 1990)

En contraste con los buenos resultados encontrados por los autores antes mencionados, la ausencia de ovulación en estos animales podría deberse bien a alteraciones en el crecimiento folicular obtenido como respuesta a la administración del Ganarelix mas el FSH exógeno o bien a la existencia de algún tipo de alteración endocrina en el eje hipotálamo-hipofisis-ovario, que condicionaría la liberación de LH. La segunda hipótesis se basa en que los animales seleccionados para esta investigación proceden de un rebaño de vacías en las cuales no se tuvo el historial ginecológico que nos indicarían si fueron animales con ovulaciones normales post empadre; Bravo (1997) y Sumar (1983) describen la presencia de folículos quísticos y Adams *et al.* (1991b), Tibary y Anouassi (1997) de folículos hemorrágicos, ambas estructuras presentan similitudes y algunas diferencias, pero se desconocen sus efectos sobre la función reproductiva, lo que concuerdan con los resultados

observados a la ecografía de los animales el día 10 de tratamiento, lo que indicaba que no se obtuvieron las ovulaciones respectivas.

La diferencia encontrada entre los dos tratamientos (0.15 mg) y (0.30 mg) fuera de la influencia de los dos inductores de ovulación (hCG y Macho vasectomizado), se debería a que el efecto de la dosis está influenciando en el desarrollo de los receptores de LH a nivel de las células de la teca en el folículo en crecimiento, lo que con llevaría a que el folículo pre ovulatorio no presentaría suficientes receptores para LH exógena y endógena. Y otro podría darse es lo que Lopez (2004) en ovinos indica que la acción del antagonista de GnRH en la supresión de la concentración de LH a nivel sanguíneo prosiguió después de 7 días de aplicado la dosis única (1.5 y 3.0 mg), demostrando que podría estar sucediendo lo mismo con nuestro tratamiento ya que no se midió la concentración de esta hormona, y que el desarrollo folicular pre ovulatorio (folículos ≥ 8 mm) se presentaron al día 6 de tratamiento donde todavía podría haberse influenciado por el antagonista de GnRH.

CONCLUSIONES

- Los niveles sanguíneos de FSH tras la administración subcutánea de dosis únicas de (0.15 y 0.30 mg) de Ganarelix fue de 0.775 y 0.774 respectivamente; Hay un efecto dosis dependiente sobre la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, disminuyendo los niveles plasmáticos medios e inhibiendo la pulsabilidad de la FSH.
- El número de folículos encontrados tras la administración subcutánea de dosis únicas de 0.15 mg y 0.30 mg de Ganarelix en el protocolo de súperovulación fue de 20.8 y 13.9 respectivamente, Lo que demuestra que los folículos gonadotropo-receptivo obtenidos después de la administración de una dosis menor de Ganarelix, estimulan los folículos primarios uniformemente hasta alcanzar tamaños preovulatorios en respuesta a la administración de eCG.
- El número de cuerpos lúteos por efecto de la administración de dosis únicas de 0.15 mg y 0.30 mg de Ganarelix fue de 4.35 y 2.52 respectivamente, los resultados son muy bajos atribuyéndose a factores endocrinológicos a nivel del eje hipotálamo – hipófisis – gónada; como la presencia de receptores de LH a nivel del folículo pre ovulatorio y los aspectos ginecológicos de los animales seleccionados.

RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones del uso del Ganarelix en camélidos sudamericanos.
- Determinar el factor que imposibilita la ovulación oportuna de los folículos preovulatorios a causa del Ganarelix en alpacas.
- Aplicar la súperovulación con Ganarelix en protocolos de transferencia de embriones en vitrio.
- Realizar más estudios sobre concentración sanguínea de las hormonas gonadotropinas durante el desarrollo folicular.

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., Quiroga, M., 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., Sumar, J., Kindahl, H., Forsberg, M. y Edqvist, L. (1998): Plasma concentrations of 15-ketodihydro-PGF (2-alpha), progesterone, estrone sulfate, estradiol -17beta and cortisol during late-gestation, parturition and the early postpartum period in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science.* 50, 111-121.
- Aba, M., Quiroga, M., 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., Kindahl, H., Forsberg, M., Quiroga, M. y Auza, N. (2000). Levels of progesterone and changes in prostaglandins F2a release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Anim Reprod Sci.* 39(1-2): 87-97.

- Aba, M., Chaves, M., Agüero, A., Egey, J., Quiroga, M. y Rutter, B. (2000). Endocrine and structural changes during follicular waves in llamas. In: *14^o International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm. Suecia. pg 63.
- Aba, M., Miragaya, M., Capdevielle, E., 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.
- Adam, C., Moir, C. y Shiach, P. (1989): Plasma progesterone concentrations in regnant non-pregnant llamas (*Lama glama*). *Vet. Rec.* 125, 618-620.
- Adams, G., Griffin, P. y Ginther, O. (1989): In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biology of Reproduction*. pp: 551-558.
- Adams, G., Sumar, J. y Ginther, O. (1990): Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod. Fert.* pp: 535.
- Adams, G., Sumar, J. y Ginther, O. (1991a): Form and function of the corpus luteum in llamas. *Anim. Reprod. Sci.* 24, 127-138.
- Adams, G., Sumar, J. y Ginther, O. (1991b): Hemorrhagic ovarian follicles in llamas. *Theriogenology*. 35, 557-568.
- Adams, G., Matteri, R., Kastelic, J., Ko, J. y Ginther, O. (1992a): Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fert.* 94, 177-188.
- Adams, G., Matteri, R. y Ginther, O. (1992b): Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fert.* 96, 627-664.

- Adams, G. (1999): Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 17-32.
- Adams, G. y Ratto, M. (2001): Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Rev Inv. Vet Perú. Suppl.* 1, 134 -141.
- Adams, G. (2001). Comparative aspects of follicular dynamics in camelids. En: *Rev Inv Vet. Perú. Suplemento 1. XXIV Reunión científica APPA.* Lima. p. 142-146.
- Agüero, A., Miragaya, M., Ferrer, M., Capdevielle, E., Chaves, M. y Rutter, B. (2001): Follicular dynamics in (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology.* 34, 1119-1127.
- Alabart, J.L.; Olivera, J.; Roche, A.; Cognie, Y.; Aguilar, B.; Cocero, M.J.; Echegoyen, E.; Folch, J. (2001). Superovulación de ovejas Rasa Aragonesa mediante pFSH/LH y un antagonista de la GnRH (Antarelix). *ITEA, 22 (Volumen Extra):* 763-765.
- Albano, C., Smith, J., Camus, M., Riethmuller-Winzen, H., Van Steirteghem, A. y Devroey, O. (1997). Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix during controlled ovarian stimulation. *Fertil. Steril,* 65: 917-22.
- Albano, C., Feberbaum, R. y Smitz, J. (2000): Ovarian stimulation with hMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone LHRH-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. *Human Reprod.,* 153: 526-31.

- Alberio, R. y Aller, J. (1996): Control y sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de progesterona exógena en llamas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 16(4), 325329.
- Aller, J., Cancino, A., Rebuffi, G. y Alberio, R. (1999). Inducción de la ovulación en llamas. En: *Res. II Cong. Mund. sobre Camélidos*, Cusco. Perú. p 91.
- Aller, J., Rebuffi, G. y Cancino, A. (2002a): Superovulación response to progestogen – eCG treatment in vicugna (*Vicugna vicugna*) in semicaptive conditions. *Theriogenology.* 57, 576.
- Ancco, E. (2013). *Respuesta a dos Dosis Superovulatorias con eCG en Alpacas Suri en época de Empadre.* (Tesis Pregrado). FMVZ, UNA – Puno.
- Anderson, P. (1997). Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(1):33-46.
- Araínga, M. (2002). *Estudio del efecto de la GnRH en el proceso de reconocimiento maternal de la preñez sobre la sobrevivencia embrionaria en alpacas (*Lama pacos*).* (Tesis Bachillerato). Fac. Med. Vet. UNMSM. Lima-Perú. 51 p.
- Arthur, G., Noakes, D. y Pearson, H. (1991). *Reproducción y obstetricia veterinaria.* 6 Madrid: McGraw-Hill. 150 p.
- Bó, G., Cutaia, L., Souza, A. y Baruselli, E. (2009). *Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche utilizando dispositivos con progesterona.* Recuperado el 26 de agosto del 2017, de: www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/145IATF.pdf.

- Bouke, D., Adam, C., Kyle, C., Young, P. y Mc Evo, T. (1992): Superovulation and embryo Transfer in the llama. *Proc. Ist. Camel Conf.* 183-185.
- Bourke, D., Adam, C., Kyle, C., Young, P. y Mc Evo, T. (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., Kyle, C., Mc Evo, T., Young, O. y Adam, C. (1994): Ovarian Responses To pmsg and FSH in llama. *European Symp on South American Camelids*, 75-81.
- Bourke, D., Kyle, C., Mc Evo, T., Young, O. y Adam, C. (1995a): Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology*. 44, 255-268.
- Bravo, W. y Sumar, J. (1985). Actividad folicular del ovario de la alpaca. En: *Libro de Res. V Conv. Int. sobre Cam. Sud. Cusco Perú.* pg. 7.
- Bravo, W., Fowler, M., Lasley, B. y Stabenfeldt, G. (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. y Sumar, J. (1989): Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal Reproduction Science*. 21: 271-281.
- Bravo, W., Fowler, M., Stabenfeldt, G. y Lasley, B. (1990a): Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology Reproduction*. 43, 579-585.
- Bravo, W., Fowler, M., Stabenfeldt, G. y Lasley, B. (1990b): Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology*. 33, 891-899.

- Bravo, W., Stabenfeldt, G., Lasley, B. y Fowler, M. (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., Stabenfeldt, G., Fowler, M. y Lasley, B. (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. (1993): Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). *anim. Reprod. Sci.* 32, 245-252.
- Bravo, W., Fowler, M. y Lasley, B. (1994): The postpartum llama: fertility after parturition. *Biol. Reprod.* 51, 1084-1087.
- Bravo, W., Lasley, B. y Fowler, M. (1995a): Resumption of ovarian follicular activity and uterine involution in the postpartum llama. *Theriogenology.* 44, 783-791.
- Bravo, W., Tsutsui, T. y Lasley, B. (1995c): Dose response to equine chorionic gonadotropin and subsequent ovulation in llamas. *Small Rumin. Res.* 18, 157-163.
- Bravo, W., Sidkmore, J. y Zhao, X. (2000): Reproductive aspects and storage of semen camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 173-193.
- Brebion, P., Belloc, J., y Briois, M. (1990): Elite Lacaune ewes pretreated with a GnRH antagonist yield more usable embryos following pFSH. *Proc. 6th Meet. Assoc. Europ. Transf. Emb. (AETE)*, 12 (abstr).
- Brown, B. (2000). A review on reproduction in south american camelids. *Anim Reprod Sci.* 58: 169-195.
- Coccia, M., Comparetto, C., Bracco, G.L. y Scarselli, G. (2004): GnRH antagonists. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 115: 44-56.

- Cognie, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51: 105-16.
- Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N. y Mermillod, N. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology*, 59: 171-188.
- Conn, P. y Crowley, W. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual Review of Medicine*, 45: 391-405.
- Correa, J., Ratto, M. y Gatica, R. (1994): Actividad estral y Respuesta ovárica en alpacas y llamas tratadas con Progesterona y Gonadotropina *Arch. Med. Vet.* 26:59-64.
- Correa, J., Ratto, M. 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.
- Cháves, M., Aba, M., 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., Yuen, Z. y Pan, G. (1985): Semen induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J. Reprod. Fétil.* 73, 335-339.
- Chun, S., Eisenhauer, K., Minami, S., Billig, H., Perlas, E. y Hsueh, A. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle – stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*. 137: 1447-1456.
- Clarke, I. (1987). GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology*. 46: 82-88.

- Del Campo, M., Del Campo, C., Donoso, M. y Ginther, O. (1996a): Recuperación y morfología de ovocitos de llamas (*Lama glama*). / *Congreso Mundial sobre camélidos*. Cajamarca-Perú. pp: 7.
- De Jong, D., Macklon, Ns., Mannaerts, Bm., Coeling-Bennik, H. y Fauser, B. (1998). High dose gonadotropin-releasing hormone antagonist (ganirelix) may prevent ovarian hyperstimulation syndrome caused by ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 13 (3): 573-575.
- De Rensis, F. y López-Gatius, F. (2014). Use of Equine Chorionic Gonadotropin to Control Reproduction of the Dairy Cow: A Review. *Reprod Domest Anim.* doi: 10.1111/rda.12268.
- Diedrich, K., Diedrich, C., Santos, E., Zoll, C., Al-Hasani, S., Reissmann, T., Krebs, D. y Klingmuller, D. (1994): Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Human Reprod.*, 9: 788-791.
- D'occhio, M., Novoa, C. y Vera, W. (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.
- England, B., Foote, W., Matthews, D., Cardozo, A. y Riera, S. (1969): Ovulation and Corpus luteum function in the llama (*Lama glama*). *J. Endocr.* 45, 505-513.
- Felberbaum, R., Reismann, T., Zoll, C., Kupler, W., Al-Hasani, S. y Diedrich, C. (1995): GnRH antagonists in gynecology: initial results within the scope

- of controlled ovarian hyperstimulation. *Gynakol. Geburtshilfliche Rundsch.*, 35: 113-7
- Fernández-Baca, S., Maden, D. 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.
- Fernandez-Baca, S., Hansel, W. y Novoa, C. (1970c). Corpus luteum function in the alpacas. *Biol. Reprod.* 3(2):252-261.
- Fernández-Baca, S. (1993). Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Animal Reproduction Science* 33: 307-323.
- Ferrer, M., 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.
- Findlay, J. (1993). An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod.* 48: 15-23.
- Fortune, J. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 78: 135-163.
- Frydman, R., Cornel, C., De Ziegler, D., Taieb, J., Spitz, I. y Bouchard, P. (1992). Spontaneous luteinizing hormone surges can be reliably prevented by the timely administration of a gonadotrophin releasing hormone antagonist (Nal-Glu) during the late follicular phase. *Human Reprod.*, 7: 930-933.

- Geller, M. (2001) *Fertilización in vitro: Agonistas y Antagonistas de GnRH*. Recuperado el 24 de setiembre del 2017. www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=16197&pagina=2
- Gonzalez-Bulnes, A., Souza, C., Campbell, B., Scaramuzzi, R. y Baird, D. (2003c). The effect of a single long-acting injection of GnRH antagonist on ovarian follicular development in sheep. *Reproduction Abstr. Series.*, 30: 65.
- Gonzalez-Bulnes, A., Lopez-Sebastian, R., Veiga-Lopez, A., Souza, C., Mcneilly, A. (2004b). Restoration of endocrine and ovarian function after stopping GnRH antagonist treatment in goats. *Theriogenology*.
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Garcia-Garcia, R., Souza, C., Lopez-Sebastian, A. y Mcneilly, A. (2004c). Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. *Theriogenology* (inpress).
- González-Mencio, F., Manns, J. y Murphy, B. (1978): FSH and LH activity of PMSG from mares at different stages of gestation. *Anim. Reprod. Sci.* 1, 137-144.
- Gordon, K. (2001). Gonadotropin-releasing hormone antagonists :implications for oocyte quality and uterine receptivity. *Ann. of the New York Acad. of Sci.*, 943: 49-54.
- Greenwald, G. y Roy, S. (1994). Follicular development and its control. En: Knobil JR, Raven NJ, eds. *The physiology of reproduction*. 2ª ed. New York: Knobil and Nelly J. Raven. p 640-650.

- Grimek, H., Gorski, J. y Wentworth, B. (1979): Purification and characterization of bovine Follicle-Stimulating hormone: comparison with ovine follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 104, 140-147.
- Hafez, E. (1996). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 6ª edición. Ed. Interamericana- Mc Graw-Hill. México.
- Hafez, E. 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.
- Hammond, J., Mondschein, J., Samaras, S. y Canning, S. (1991). The ovarian insulinlike growth factors, a local amplification mechanism for steroidogenesis and hormone action. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 40(1-3):411- 416.
- Hernández, E. (2000). Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation: the Rubicon for GnRH antagonists. *Human Reproduction*, 15: 1211-1216.
- Hincapié, J. (2005): *Reproduccion Animal Aplicada: Fundamentos de Fisiología y Biotecnología*. Segunda Edición. Litocom Editores, Honduras.
- Huanca, W., Cárdenas, O., Cordero, A., Huanca, T. y Sapaná, 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. y Adams, G. (2001): Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 1, 462-463.

- 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.
- Huirne, J. y Lambalk, C. (2001). Gonadotropin-releasing hormone receptor antagonists. *Lancet*, 358: 1793-1803.
- Illera, M. (1994). Bases neurológicas de la reproducción. En: Illera M, ed. *Reprod Anim Domest*. España: Aedos. p 1-25.
- 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.
- Kim, S., Thiessen, P., Bolton, E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B., Wang, J., Yu, B., Zhang, J. y Bryant, S. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016 4 de enero; 44 (D1): D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175] doi: 10.1093 / nar / gkv951.
- Kistner, R. (1976). Sequential use of clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril.*, 27: 72-82.
- Lauderdale, J. y Zimbelman, R. (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.
- Lauria, A., Genazzani, A., Oliva, O., Inaudi, R., Cremonesi, F., Monittola, C. y Aureli, G. (1982a): Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced by humanmenopsausal gonodotrophin. *J. Reprod. Fétil.* 66, 219-225.
- León, J., Smith, B., Timm, K. 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. (1996). *Follicular activity and ovulation of ewes during the breeding season and anestrus*. (Tesis PhD). Univ. Guelph, Canada.
- 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. (1999c): Efecto de la progesterona exógena y endógena en alpacas en celo sobre la ovulación, fertilización y gestación. // *Congreso Mundial sobre Camélidos*. Cusco-Perú. pp: 89.
- Ling, N., Liu, X., Malkowski, L., Gua, Y., Erickson, G. y Shimasaki, S. (1993). Structural and functional studies of the insulin-like growth factor binding proteins in the ovary. *Growth Regul.* 3:70-74
- Lopez, A., Huanca, W., Leyva, V., Falcon, N., Huanca, T. y Ratto, M. (2006): inducción de la ovulación en llamas mediante la administración intramuscular del plasma seminal de llama, alpaca y toro. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 17 (2): 114-118.

- Lopez, C. (2004): *supresión del efecto de dominancia folicular en protocolos de estimulación ovárica en ganado ovino mediante la administración de una dosis única de antagonista de GnRH*. (Tesis doctoral); Universidad Complutense de Madrid.
- Mendoza, R., Pozo, A., Huanca, T. y Naveros, M. (2012): Produccion y evaluación de embriones por superovulacion mediante la utilización de la eCG y FSH en alpacas (*Vicugna pacos*) huacaya. *Rev. Spermova*. 2 (1): 49-50.
- Miragaya, M., Aba, M., Capdevielle, E., Ferrer, M., Chaves, M., Rutter, B. y Agüero, A. (2004): Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuña (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*. 61, 663-671.
- Monniaux, D., Chupin, D. y Saumande, J. (1983): Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*. 19, 55-81.
- Monniaux, D., Monget, P., Besnard, C., Huet, C. y Pisselet, C. (1997). Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*. 47: 3-12.
- Moor, R., Kruij, A. y Green, D. (1984): Intra ovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology*. 22, 103-116.
- Murdoch, W. (1995). Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod*. 53(1):8-12
- Murillo, Y. (2012). *Evaluación de Embriones en respuesta a dos Dosis Superovulatorias con eCG en Alpacas Suri en época seca*. (Tesis Pregrado). FMVZ, UNA – Puno.

- Novoa, C., Sumar, J. (1968): Colección de Huevos in vivo y ensayos de transferencia en alpacas. *III Boletín extraordinario, IVITA, UNMSM* pp 31-34.
- Novoa, C. (1970): Reproduction in the camelidae. *J. Reprod. Fert. (review)*. 22, 3-20.
- Novoa, C. (1991). Fisiología de la reproducción en la hembra. En: *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. 1ª ed. Chile: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. p 91-109.
- Novoa, C. (1992). Reproducción en camélidos. *Rev Cien Vet Perú* 8(4): 9-11
- Novoa, C., Franco, E., Garcia, W. y Pezo, D. (1999): Dosis de gonadotropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 10, 48-53.
- Olivennes, F., Alvarez, S., Bouchard, P., Fanchin, R., Salatbaroux, J. y Frydman, R. (1998). The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Human Reprod.*, 13: 2411-2414.
- Olivennes, F., Ayoubi, J., Faschin, R., Rongières-Bertrand, C., Hamamah, S., Bouchard, P. y Frydman, R. (2000): GnRH antagonist in single-dose applications. *Human Reprod. Update*, 6: 313-317.
- Oussaid, B., Lonergan, P., Khatir, H., Guler, A., Monniaux, D., Touze, J., Beckers, J., Cognie, Y. y Mermillod, P. (2000). Effect of GnRH antagonist-induced prolonged follicular phase on follicular atresia and oocyte developmental competence in vitro in superovulated heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 118: 137-144.

- Palomino, H., Tabacchi, L., Avila, E. y Li, O. (1987): Ensayo Preliminar de Transferencia de Embriones en Camelidos Sudamericanos. *Rev. Cam. Sudam. IVITA*, Perú 5:10-17.
- 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. / *Congreso Mundial sobre Camélidos*. Cajamarca–Perú. pp: 26.
- Pan, G., Chen, Z., Liu, X., Li, D., Xie, Q., Ling, F. y Fang, L. (2001). Isolation and purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology* 55: 1863-1879.
- Papkoff, H. (1978): Relationship of PMSG to the pituitary gonadotrophins. En: *Control of reproduction in the cow*. Ed: J.M. Srrenan. Martín Nijhoff, The Hague. pp: 73-86.
- Perez, G. gonadotropinas. Recuperado el 25 de setiembre del 2017. www.gonadotropina.com/
- Pollard, J., Littlejohn, R. y Scott, I. (1994): The effect of mating on the sexual receptivity of female alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 34, 289-297.
- Quispe, J. (2015). *Respuesta ovarica y recuperacion de embriones por efecto de dosis de gonadotropina corionica equine (eCG) en alpacas*. (Tesis Pregrado). FMVZ, UNA – Puno.
- Ratto, M., Gatica, R. y Correa, J. (1997): Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*. 48, 325-330.

- Ratto, M., Singh, J., Huanca, W. y Adams, G. (2003): Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology*. 60, 1645-1656.
- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J. y Adams, G. (2005): In Vitro and In Vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*. 63, 2445 –2457.
- Ríos, M. (1989). *Presencia de un factor de inducción de la ovulación en el semen de alpacas y toro*. (Tesis de Médico Veterinario). Facultad De Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor De San Marcos. Lima. 30 p.
- Roche, J. y Ireland, J. (1984): Manipulation of ovulation in cattle. Proc. 10th Int. Congr. Reprod. A. I. Urbana –Champaing. 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.
- 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.
- Savio, J., Boland, M. y Roche, J.: «Development of Dominant Follicles and Length of Ovarian Cycles in Postpartum Dairy Cows». *J. Reprod. Fert.* 88: 582-591, 1990.
- 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 reponses after application for superovulation in cattle. En: *Control of reproduction in the cow*. Ed: J.M. Sreenan. Martin Nijhoff, The Hague. pp: 122-142.

- Silva, M., Smulders, J., Guerra, M., Valderrama, X., Letelier, C., Adams, G. y Ratto, M. (2011). Cetrorelix suprime la oleada preovulatoria de LH y la ovulación inducida por el factor inductor de la ovulación (OIF) presente en el plasma seminal de llama.
- Steinkampf, M., Mendelson, C. y Simpson, E. (1988). Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 59: 93-99.
- Sirard, M., Robert, C., Gagné, D., Barnes, F. y Bousquet, D. (2000): Oocyte quality and embryo production in cattle. *Biocell* 24. (3), 256.
- Sociedad Iberoamericana de Información Científica (2000): Resumen objetivo elaborado por el comité de redacción científica de SIIC en base al artículo original completo.
- Souza, C., Scaramuzzi, R., Deghenghi, R., Campbell, B. y Baird, D. (2000). The effect of a single injection of a depot preparation of GnRH antagonist (Teverelix INN) on ovarian function in sheep. Joint Summer Meeting 2000. *Society for the Study of Fertility*. Edimburgo (Reino Unido). 31 Julio-2 Agosto 2000.
- Spies, H., Pau, K. y Yang, S. (1997): Coital and estrogen signals: a contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and rhesus monkey. *Biol. Reprod.* 56, 310-319.
- Sumano, H. (2006): *Farmacología Veterinaria*. Tercera Edición. McGrawhill Interamericana, Mexico.

- Sumar, J. (1979). Estudio del crecimiento y atresia de los folículos de Graff en el ovario de la alpaca. *Libro de resúmenes de proyectos de investigación realizados por la UNMSM (1975-1979)*. Tomo II. p. 119.
- Sumar, J. (1981). Efecto endocrino fisiológico del receptal en alpacas. En: *Res. IV Conv. Int. sobre Camelid. Sudamer.* Punta Arenas. Chile.
- 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., Leyva, V., Franco, E. y Foot, W. (1987^a). Incidence of estrus and spontaneous ovulation in huacaya type alpacas. Utah State Univ. USA. *Improv. Reprod. Perform. of small ruminants. US/Aid Title XII small ruminants-CRSP. Final reports 6.2.7.*
- Sumar, J., Fredriksson, G., Alarcón, V., Kindahl, H. y Edqvist, L. (1988). Levels of 15-Keto-13, 14-dihydro-PGF_{2a}, progesterone and oestradiol-17 β after induced ovulations in llamas and alpacas. *Acta Vet Scand* 29(3-4): 339-346.
- Sumar, J. (1988a): Removal of the ovarios or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Vet. Scand.* 83, 133-141.
- Sumar, J. y Bravo, 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 la ovulación de alpacas y de llamas. *Rev. Pec. Inv. IVITA.* Perú 6(1):17-21.

- Sumar, J., Bravo, W. y Foote, W. (1993a): Sexual receptivity and time of ovulation in alpacas. *Small Ruminant Research*. 11, 143-150.
- 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. En: *Memorias I Symposium Internacional Avances en Reproducción de Rumiantes*. Perú. p 30-55
- Sumar, J. (2002). Llamas y alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7^a ed. México: McGraw-Hill. p 224-242.
- The Ganirelix Dose-Finding Study Group. (1998): A doubleblind, randomised, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotropin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Human Reprod.*, 13: 3023-31.
- Tibary, A. y Memon, M. (1999): *Reproductive physiology in the female South American camelidae*. 6, 217-233.
- 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.
- Tilly, J., Billig, H., Kowalski, K. y Hsueh, A. (1992). Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of

- apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase – dependent mechanism. *Molec Endocrinology*. 6: 1942-1950.
- Vaughan, J., Occhio, M. y Macmillan, K. (2000). Endocrine and structural changes during follicular waves in llamas. In: *14^o International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm. Suecia. pg 63.
- Vaughan, J. (2001a): *Control of ovarian follicular growth in the alpaca (Lama pacos)*. (PhD. Thesis). Central Queensland University.
- Vaughan, J., Macmillan, K., Anderson, G. y D'Occhio, M. (2003): Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. *Aust. Vet. J.* 81, 86-90.
- Vaughan, J. (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., Macmillan, K. y D'Occhio, M. (2004): Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science*. pp: 353-361.
- Vaughan, J. y Tibary, A. (2006): Reproduction in female South American camelids: *A review and clinical observations*. *Small Ruminant Research*. 61, 259-281.
- Velasquez, C. y Novoa, C. (1999): Superovulacion con PMSG aplicada en fase follicular y fase luteal en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Del Perú* 10(1): 39-47.
- Velásquez, F., Málaga, J. y Bravo, W. (1999): Citología exfoliativa del útero de la alpaca. In: *Libro de resúmenes II Congreso Mundial Sobre Camélidos*, vol. 84 Cusco-Perú. (abstract).

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.

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

www.rxlist.com/ganirelix-drug.htm. Recuperado el 28 de setiembre del 2017.



ANEXOS

Anexo 1. Materiales e insumos utilizados**Materiales usados para la realización del objetivo 1**

- Marcadores (pintura)
- Hormona antagonista de GnRH (Ganarelix)
- Jeringas hipodérmicas
- Tubos Vacutainer
- Centrifuga
- Equipo lector de ELISA
- Kit de Test de inmuno enzima (ELISA) para FSH (Marca Diagnostic automation inc.).
- Congeladora
- Tubos de poliestireno
- Micropipetas

Materiales usados para la realización del objetivo 2

- Marcadores (pintura)
- Hormona estimulante de GnRH (ECG) dosis 750 UI
- Jeringas hipodérmicas
- Equipo de ultrasonografía Aloka 500

Materiales usados para la realización del objetivo 3

- Marcadores (pintura)
- Hormona inductora de ovulación (hCG) dosis de 750 UI
- Jeringas hipodérmicas
- Equipo de ultrasonografía Aloka 500

Anexo 2. Cuadro de resultados

Cuadro 4. Niveles de FSH sanguíneo con 0.15 mg de Ganarelix

N° arete	N° animal	0 horas	1 hora	3 horas
H0336	1	0.90	0.98	0.95
H3334	3	1.02	1.01	0.99
H1874	4	0.64	0.85	0.77
H3862	5	1.04	1.00	1.00
H5668	7	0.90	0.98	0.95
H5296	8	1.03	1.02	1.01
H1290	10	0.55	0.65	0.63
H1697	12	0.96	1.02	1.01
H5343	14	1.04	1.00	1.00
H3518	15	1.02	1.01	0.99
H0669	17	0.69	0.66	0.68
H5241	18	0.64	0.85	0.77
H0017	21	0.55	0.54	0.66
H1155	22	0.56	0.61	0.58
H5113	26	0.55	0.65	0.63
H1191	30	0.61	0.58	0.55
H2016	31	0.54	0.62	0.58
H2044	33	0.55	0.54	0.66
H2726	35	0.69	0.66	0.68
H5629	38	0.56	0.61	0.58

Promedio	0.752	0.792	0.783
Desv. Stand.	0.206	0.192	0.179

PROMEDIO DE LA DOSIS 0.15 mg DE GANARELIX	0.775
DESVIACION ESTANDAR DE LA DOSIS 0.15 mg DE GANARELIX	0.190

Anexo 3. Cuadro de resultados

Cuadro 5. Niveles de FSH sanguíneo con 0.30 mg de Ganarelix

N° arete	N° animal	0 horas	1 hora	3 horas
H0250	2	0.96	0.93	1.05
H3661	6	0.97	1.00	0.98
H1513	9	0.99	0.98	0.96
H1198	11	1.03	0.98	0.98
H0047	13	1.02	0.99	1.04
H0647	16	1.04	1.00	1.01
H3569	19	0.76	0.70	0.73
H2663	20	0.56	0.56	0.55
H3501	23	0.60	0.59	0.56
H0082	24	0.60	0.55	0.55
H3771	25	1.04	1.00	1.01
H1026	27	0.97	1.00	0.98
H4404	28	0.55	0.65	0.60
H2967	29	0.60	0.59	0.56
H0292	32	0.55	0.65	0.60
H0564	34	0.59	0.56	0.56
H0028	36	0.96	0.93	1.05
H0647	37	0.64	0.60	0.56
H5472	39	0.54	0.54	0.64
H0086	40	0.59	0.56	0.56

Promedio	0.778	0.768	0.776
Desv. Stand.	0.209	0.200	0.218

PROMEDIO DE LA DOSIS DE 0.30 mg DE GANARELIX	0.774
DESVIACION ESTÁNDAR DE LA DOSIS DE 0.30 mg DE GANARELIX	0.206

Anexo 4. Cuadro de resultados

Cuadro 7. Numero de folículos observados en alpacas con 0.15 mg de Ganarelix

N° Cuerpo	día 1 FSH		día 2		día 3		día 4		día 5		día 6		día 7		día 8		día 9		TOTAL			
	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	animal	
1	3	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	3	2	0	0	17.0	13.0	30.0
3	1	1	1	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	12.0	15.0	27.0
4	5	2	2	1	2	1	2	4	2	4	3	5	4	5	4	4	4	4	28.0	30.0	58.0	
5	2	2	4	1	1	4	3	1	4	2	5	4	6	5	3	3	3	3	31.0	25.0	56.0	
7	2	3	3	4	3	3	3	4	4	4	5	4	4	4	6	3	0	0	30.0	29.0	59.0	
8	5	2	2	1	2	1	2	4	2	4	3	5	4	5	4	4	4	4	28.0	30.0	58.0	
10	3	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	3	2	0	0	17.0	13.0	30.0	
12	3	2	4	1	2	1	2	1	2	1	2	1	4	1	4	3	5	4	28.0	15.0	43.0	
14	1	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	0	22.0	19.0	41.0	
15	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	11.0	8.0	19.0	
17	1	1	3	2	3	2	4	4	4	4	5	5	6	6	4	4	0	0	30.0	28.0	58.0	
18	3	3	2	2	1	1	2	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	23.0	20.0	43.0	
21	1	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	0	22.0	19.0	41.0	
22	1	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	0	22.0	19.0	41.0	
26	1	0	2	1	2	1	1	4	4	2	3	2	7	4	5	4	4	4	29.0	22.0	51.0	

30	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	0	0	11.0	11.0	22.0	
31	1	1	3	1	3	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	0	0	15.0	13.0	28.0
33	1	1	1	4	2	4	1	1	1	1	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	25.0	30.0	55.0
35	2	3	3	1	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	6	3	0	0	29.0	26.0	55.0
38	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	9.0	8.0	17.0

Promedio ovario derecho	21.95
Desv. Stand. Ovario derecho	7.38
Promedio ovario izquierdo	19.65
Desv. Stand. Ovario izquierdo	7.52

PROMEDIO DE LA DOSIS 0.15 mg DE GANARELIX	20.8
DESVIACION ESTANDAR DE LA DOSIS 0.15 mg DE GANARELIX	7.44

Anexo 5. Cuadro de resultados

Cuadro 8. Numero de folículos observados en alpacas con 0.30 mg de Ganarelix

N° Cuerpo	día 1 FSH		día 2		día 3		día 4		día 5		día 6		día 7		día 8		día 9		TOTAL		
	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI	animal
2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10.0	10	20.0
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	13.0	9	22.0
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	5	4	11.0	19	30.0
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	3	1	4	4	4	13.0	19	32.0
13	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	2	2	2	4	2	3	0	17.0	11	28.0
16	1	1	3	1	3	1	4	1	4	2	2	2	2	2	2	2	4	2	17.0	21	38.0
19	1	1	2	1	2	1	3	2	4	2	5	2	3	2	3	2	3	2	17.0	23	40.0
20	1	1	2	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	13.0	16	29.0
23	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	3	4	16.0	12	28.0
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9.0	9	18.0
25	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	5	2	4	11.0	19	30.0
27	1	1	1	1	3	2	3	2	3	2	3	3	1	3	1	2	1	2	12.0	21	33.0
28	1	2	1	1	1	1	3	2	3	2	2	2	2	1	2	1	0	1	15.0	13	28.0
29	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	3	4	16.0	12	28.0

32	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	3	4	16.0	12	28.0
34	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9.0	8	17.0
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9.0	9	18.0
37	1	0	1	3	1	3	2	4	2	4	2	3	2	3	2	22.0	18	40.0
39	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	2	3	2	0	0	17.0	14	31.0
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9.0	9	18.0

Promedio ovario derecho	13.60
Desv. Stand. Ovario derecho	3.63
Promedio ovario izquierdo	14.20
Desv. Stand. Ovario izquierdo	4.85

PROMEDIO DE LA DOSIS 0.30 mg DE GANARELIX	13.90
DESVIACION ESTANDAR DE LA DOSIS 0.15 mg DE GANARELIX	4.24

Anexo 6. Cuadro de resultados

Cuadro 10. Numero de cuerpos lúteos observados a la ecografía en alpacas tratadas con 0.15 mg de Ganarelix

a) Numero de cuerpos lúteos con aplicación de hCG

N° arete	N° Cuerpo	día 9		día 10		PROMEDIO		
		OD	OI	OD	OI	OD	OI	animal
H1874	4	0	0	4	4	2	2	2.00
H3862	5	0	0	3	3	1.5	1.5	1.50
H5668	7	5	4	6	4	5.5	4	4.75
H5296	8	0	0	4	4	2	2	2.00
H0669	17	6	4	6	6	6	5	5.50
H5113	26	0	0	4	4	2	2	2.00
H2016	31	1	1	1	1	1	1	1.00
H2044	33	0	0	5	5	2.5	2.5	2.50
H2726	35	5	3	6	4	5.5	3.5	4.50
H5629	38	1	1	1	1	1	1	1.00

Promedio	5.35
Desviación estándar	3.29

b) Numero de cuerpos lúteos con uso de machos vazectomizados

N° arete	N° Cuerpo	día 9		día 10		PROMEDIO		
		OD	OI	OD	OI	OD	OI	animal
H0336	1	3	2	4	2	3.5	2	2.75
H3334	3	0	0	1	2	0.5	1	0.75
H1290	10	3	2	3	2	3	2	2.50
H1697	12	0	0	4	4	2	2	2.00
H5343	14	1	1	2	1	1.5	1	1.25
H3518	15	1	1	1	1	1	1	1.00
H5241	18	0	0	4	4	2	2	2.00
H0017	21	1	1	2	1	1.5	1	1.25
H1155	22	1	1	2	1	1.5	1	1.25
H1191	30	1	3	1	3	1	3	2.00

Promedio	3.35
Desviación estándar	1.59

PROMEDIO DE LA DOSIS 0.15 mg DE GANARELIX	4.35
DESVIACION ESTANDAR DE LA DOSIS 0.15 mg DE GANARELIX	2.75

Anexo 7. Cuadro de resultados

Cuadro 11. Numero de cuerpos lúteos observados a la ecografía en alpacas tratadas con 0.30 mg de Ganarelix

a) numero de cuerpos lúteos con aplicación de hCG

N° arete	N° Cuerpo	día 9		día 10		PROMEDIO		
		OD	OI	OD	OI	OD	OI	animal
H0250	2	0	0	1	1	0.5	0.5	0.50
H3661	6	0	0	2	1	1	0.5	0.75
H0047	13	1	1	4	1	2.5	1	1.75
H0647	16	1	1	4	3	2.5	2	2.25
H3569	19	0	1	3	2	1.5	1.5	1.50
H0082	24	0	0	1	1	0.5	0.5	0.50
H4404	28	2	0	2	1	2	0.5	1.25
H0564	34	0	0	1	1	0.5	0.5	0.50
H0647	37	0	0	3	2	1.5	1	1.25
H5472	39	4	1	2	1	3	1	2.00

Promedio	2.45
Desviación estándar	1.60

b) Numero de cuerpos lúteos con uso de machos vazectomizados

N° arete	N° Cuerpo	dia 9		dia 10		PROMEDIO		
		OD	OI	OD	OI	OD	OI	animal
H1513	9	0	0	2	4	1	2	1.50
H1198	11	0	0	3	4	1.5	2	1.75
H2663	20	0	0	2	1	1	0.5	0.75
H3501	23	1	0	3	3	2	1.5	1.75
H3771	25	0	0	2	4	1	2	1.50
H1026	27	0	1	1	3	0.5	2	1.25
H2967	29	1	0	3	3	2	1.5	1.75
H0292	32	1	0	3	3	2	1.5	1.75
H0028	36	0	0	1	1	0.5	0.5	0.50
H0086	40	0	0	1	1	0.5	0.5	0.50

Promedio	2.60
Desviación estándar	1.27

PROMEDIO DE LA DOSIS 0.30 mg DE GANARELIX	2.52
DESVIACION ESTANDAR DE LA DOSIS 0.30 mg DE GANARELIX	1.43

Anexo 8. Fotografías de la ecografía de las alpacas tratadas con Ganarelix



Figura5. Ovario mostrando medidas de dos folículos

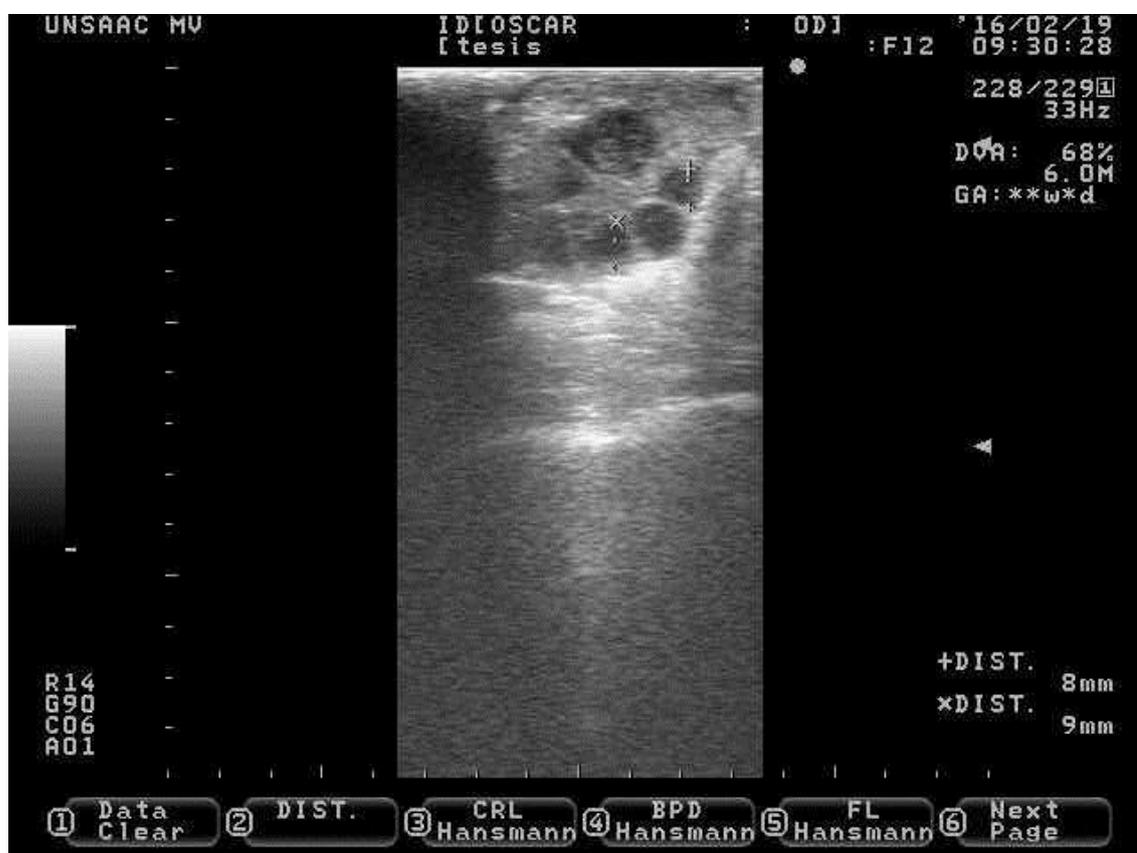


Figura 6. Ovario súper estimulado, observamos los folículos súper estimulados



Figura 7. Observación del ovario súper estimulado