



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**



**OBTENCIÓN DE OVOCITOS MEDIANTE ASPIRACIÓN**  
**FOLICULAR EN LLAMAS CON Y SIN ESTIMULACIÓN**  
**HORMONAL**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. FIDEL WASHINGTON GUTIERREZ YANA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**  
**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PUNO – PERÚ**

**2022**



## DEDICATORIA

- *A Dios, por darme la oportunidad de disfrutar de un día más para lograr mis metas y sueños.*
- *A mi querido padre Juan Francisco, por el gran apoyado en todo momento y haber depositado su confianza en mí para lograr esta profesión.*
- *A mi madre Filomena en el cielo. por darme los sueños*
- *A mi abuelito simón en el cielo por aquellos momentos tan gratos.*
- *A mi abuelita Julia en el cielo por ser mi madre gracias por el gran amor brindado y el gran apoyo incondicional.*
- *A mis hermanos Lucio, Alejandrina, María Jesus, Juana Elma, Julia. Por su comprensión, por los momentos tan gratos e inolvidables compartidos y por el gran apoyo brindado en momentos para seguir adelante y lograr esta profesión siempre los llevare en mi mente y corazón. Muchas gracias por todo.*
- *A mi hermano Lucio por haberme ayudado en los momentos más difíciles, por su gran apoyo, comprensión y sus valiosos concejos.*
- *A Danny Joel mi amigo y hermano por el gran apoyo y sueños compartidos.*
- *A Beatriz (Bea Liz)*

***Fidel W. Gutierrez Yana***



## AGRADECIMIENTOS

- *A la Universidad Nacional del Altiplano – Puno. Y A la Gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; por la formación y el sueño anhelado de ser profesional.*
- *A los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por las enseñanzas valiosas en mi formación profesional.*
- *Al Dr. Uri Harold Pérez Guerra, mi gratitud infinita y admiración y respeto por ser un investigador prestigiado, maestro admirable. por su tan acertada dirección en mi tesis, por la motivación brindada en momentos difíciles y por encaminarme en el camino de la investigación estaré agradecido siempre.*
- *Mi gratitud eterna al Dr. Manuel Guido Pérez Durand, quien me brindo su apoyo y enseñanzas tan valiosas en todo momento en mi trabajo de investigación, por haberme inculcado en el campo de la investigación, mi admiración y respeto por ser gran maestro, investigador de prestigio.*
- *A los miembros del jurado revisor del proyecto de tesis Dr. Ceferino Uberto Olarte Daza.*
- *Dr. Ciriaco Teodoro Zuñiga Zuñiga, Dra. Catacora Flores Nubia Lilia. Por la revisión y correcciones brindadas en el proyecto de investigación de tesis.*

*A mis amigos:*

- *Dany Joel, Carlos, Ítalo. Por todos los momentos alegres, gratos en la ejecución de proyectos de investigación.*
- *Luis Lozada, Marvin, Luis Choquecota. Por los momentos tan gratos compartidos y su gran apoyo incondicional mi gratitud.*



# ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE GENERAL**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN ..... 10**

**ABSTRACT..... 11**

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

**1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN..... 13**

1.1.1. Objetivo general..... 13

1.1.2. Objetivos específicos ..... 13

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

**2.1 ANTECEDENTES..... 15**

**2.2. MARCO TEÓRICO ..... 17**

2.2.1. Anatomía y Fisiología de los Camélidos Domésticos Hembra ..... 17

2.2.2. Pubertad ..... 18

2.2.3. Estacionalidad reproductiva..... 19

2.2.4. Onda folicular en camélidos ..... 20

2.2.5. Ovulación..... 22

2.2.6. Superovulación ..... 23

2.2.7. Hormonas para provocar superovulación ..... 24

2.2.8. Maduración in vivo del ovocito (ovulación) ..... 26



2.2.9. Función de la GnRH análogo en la maduración in vivo de los ovocitos.....	27
2.2.10. Acción de la hormona coriónica equina(eCG) .....	28
2.2.11. Morfología del ovocito maduro .....	30
2.2.12. El folículo .....	30
2.2.13. Aspiración folicular .....	31
2.2.14. El Ovocito.....	32

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>3.1 ÁMBITO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 ANIMALES.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3. MANEJO DE LOS ANIMALES.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4. DURACIÓN DEL ESTUDIO .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>37</b>
3.5.1 Preparación de los animales.....	37
3.5.2. Evaluación de la estimulación Ovárica.....	38
3.5.3. Protocolo de multi ovulación a diferentes dosis de eCG.....	39
3.5.4. Morfometría ultrasonográfica folicular. ....	40
3.5.5. Aspiración folicular transvaginal u ovum pick up (OPU). ....	41
3.5.6. Solución para aspiración.....	42
3.5.7. Evaluación de los ovocitos y tasa de recuperación.....	42
<b>3.8 MÉTODO ESTADÍSTICO.....</b>	<b>44</b>

### **CAPÍTULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS FOLICULARES.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. ASPIRACIÓN FOLICULAR (OPU) – OBTENCIÓN DE OVOCITOS .....</b>	<b>48</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>51</b>



<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>63</b>

**Área** : Reproducción Animal.

**Tema** : Obtención de ovocitos por aspiración folicular en llamas.

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 22 de julio del 2022



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución de las llamas para la superestimulación de los Ovarios y colección de ovocitos con diferentes cantidades de eCG. ....	36
<b>Tabla 2.</b> Características morfométricas foliculares de llamas sometidas a tres dosis de eCG. ....	46
<b>Tabla 3.</b> Número de folículos promedio en relación a los tratamientos. ....	47
<b>Tabla 4.</b> Tasa de recuperación de ovocitos según tratamiento de folículos de llamas superestimuladas con eCG. ....	48
<b>Tabla 5.</b> Categorización de COCs obtenidos según tratamiento de folículos de llamas superestimuladas con eCG. ....	49



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del ovocito.....	32
<b>Figura 2.</b> Protocolo de tratamiento hormonal usado.....	39
<b>Figura 3.</b> Administración de la hormona coriónica equina (eCG).....	63
<b>Figura 4.</b> Administración de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) ....	63
<b>Figura 5.</b> Fijación del animal con correas sobre la mesa de exploración .....	64
<b>Figura 6.</b> Aplicación de la anestesia epidural baja (lidocaína 2%) a una cantidad de 2.5 ml. ....	64
<b>Figura 7.</b> Materiales y equipo para la aspiración folicular.....	65
<b>Figura 8.</b> Transductor micro convexo con su guía de aguja para la aspiración folicular.	65
<b>Figura 9.</b> Ubicación del transductor micro convexo en el fórnix de la vagina. ....	66
<b>Figura 10.</b> Imagen del ovario con folículos múltiples por efecto de la hormona (eCG)	66
<b>Figura 11.</b> Imagen de un folículo dominante sin estimulación hormonal.....	67
<b>Figura 12.</b> Tubos Falcon con fluido folicular aspirado.....	67
<b>Figura 13.</b> Búsqueda y selección de complejo cúmulos ovocitos (COCs) .....	68
<b>Figura 14.</b> Complejo cúmulos ovocitos (COCs) seleccionados .....	68



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

<b>CS</b>	: Camélidos sudamericanos
<b>COCs</b>	: Complejo cúmulos ovocitos
<b>FF</b>	: Fluido folicular
<b>FFp</b>	: Fluido de folículos pequeños
<b>FFg</b>	: Fluido de folículos grandes o preovulatorios
<b>FSH</b>	: Hormona folículo estimulante
<b>GnRH</b>	: Hormona liberadora de las gonadotropinas
<b>ZP</b>	: zona pelúcida
<b>VG</b>	: vesícula germinal
<b>LH</b>	: Hormona luteinizante
<b>CL</b>	: Cuerpo lúteo.
<b>TCM</b>	: Medio de cultivo tisular
<b>SOFaa</b>	: Fluido oviductal sintético + aminoácidos
<b>BSA</b>	: Albúmina sérica bovina.
<b>PBS</b>	: Solución buffer fosfatada
<b>μL</b>	: Microlitro
<b>mL</b>	: Mililitro
<b>g</b>	: Gramo
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>μM</b>	: Micromolar
<b>UI</b>	: Unidad internacional
<b>mm</b>	: Milímetro
<b>IM</b>	: Intramuscular.
<b>Rpm</b>	: Revoluciones por minuto
<b>MHZ</b>	: Megahertz
<b>eCG</b>	: Gonadotropina coriónica equina
<b>°C</b>	: Grados centígrados
<b>CC</b>	: condición corporal
<b>FIV</b>	: Fertilización in vitro
<b>MIV</b>	: Maduración in vitro
<b>SFB</b>	: Suero fetal bovino



## RESUMEN

El presente estudio tuvo el objetivo principal de producir ovocitos de llamas superestimuladas en el ovario. Se utilizaron 28 llamas adultas, que se formaron 4 grupos de tratamiento, a las que se realizaron la ablación folicular para sincronizar la onda folicular. A las 48 h. se administraron la gonadotropina sérica equina (eCG) en dosis de 500 U.I., 750 U.I., 1000 U.I. y 0 U.I a los grupos I, II, III y control. Diariamente se monitoreo el crecimiento folicular hasta que se determinó que al menos 1 folículo llegue a un tamaño de  $\geq 7$  mm. A las llamas con folículos desarrollados se les administró 8 ug de GnRH y 26 h después se realizó la aspiración folicular. Para la aspiración folicular se utilizó un transductor transvaginal con su guía de aguja, línea de aspiración. La aspiración folicular se realizó guiada con un ultrasonografo y la colección de los ovocitos se hizo con una presión de 20 mL/min. La evaluación de los ovocitos se realizó con un esteroscopio evaluando su morfología. Para las características morfométricas, para los diámetros foliculares (mm); día "0" (administración de eCG), día de aspiración folicular (OPU) y tasa de crecimiento (mm/día) fueron: para el tratamiento de eCG (500 UI)  $1.84 \pm 1.07$ ,  $6.13 \pm 2.07$   $1.03 \pm 0.49$ ; para eCG (750 UI)  $1.58 \pm 0.62$ ,  $6.99 \pm 1.44$ ,  $1.37 \pm 0.42$ ; eCG (1000 UI)  $1.87 \pm 0.93$ ,  $8.08 \pm 2.29$ ,  $1.36 \pm 0.51$  y sin estimulación  $2.29 \pm 0.44$ ,  $7.61 \pm 1.0$ ,  $10.96 \pm 0.34$  ( $p \leq 0.05$ ) respectivamente. Para el número de folículos los tratamientos fueron: eCG (500 UI) folículos de 3 a 6 mm  $4.4 \pm 1.5$  y mayores a 7 mm  $2.8 \pm 1.9$ ; eCG (750 UI) folículos de 3 a 6 mm  $2.2 \pm 1.3$  y mayores a 7 mm  $4.2 \pm 1.8$ ; eCG(1000 UI) folículos de 3 a 6 mm  $3.0 \pm 1.1$  y mayores a 7 mm  $7.4 \pm 1.7$  y sin estimulación folículos de 3 a 6 mm  $9.2 \pm 1.6$  y mayores a 7 mm 1.0 ( $p \leq 0.05$ ) en todo los tratamientos. Tasa de recuperación fue de 42.31%, 50% y 67.86% para los tratamientos de 500, 750 y 1000 UI de eCG respectivamente y 50% grupo testigo (sin eCG) y la categoría de los COCs expandidos, compactos y desnudados en (%) fueron: para el tratamiento de eCG (500 UI) 50, 30 y 2 0; para eCG (750 UI) 61.11, 27.78 y 11.11; eCG (1000 UI) 55.26, 28.95 y 15.79 sin estimulación 0, 66.67 y 33.33 ( $p = 0.6576$ ) respectivamente. En conclusión, a mayor dosis de eCG mayor crecimiento folicular y con una tasa de recuperación similar.

**Palabras clave:** Llama, superestimulación, folículo, aspiración, ovocito.



## ABSTRACT

The present study had the main objective of producing superstimulated llama oocytes in the ovary. 28 adult llamas were used, which were formed into 4 treatment groups, which underwent follicular ablation to synchronize the follicular wave. At 48 hours. Equine serum gonadotropin (eCG) was administered in doses of 500 I.U., 750 I.U., 1000 I.U. and 0 I.U. to groups I, II, III and control. Follicular growth was monitored daily until it was determined that at least 1 follicle reached a size of  $\geq 7$  mm. Llamas with developed follicles were administered 8 ug of GnRH and follicular aspiration was performed 26 h later. For follicular aspiration, a transvaginal transducer was used with its needle guide, aspiration line. The follicular aspiration was guided by an ultrasonograph and the collection of the oocytes was done with a pressure of 20 mL/min. The evaluation of the oocytes was carried out with a stereoscope, evaluating their morphology. For the morphometric characteristics, for the follicular diameters (mm); day "0" (eCG administration), follicular aspiration day (OPU), and growth rate (mm/day) were: for eCG treatment (500 IU)  $1.84 \pm 1.07$ ,  $6.13 \pm 2.07$ ,  $1.03 \pm 0.49$ ; for eCG (750 IU)  $1.58 \pm 0.62$ ,  $6.99 \pm 1.44$ ,  $1.37 \pm 0.42$ ; eCG (1000 IU)  $1.87 \pm 0.93$ ,  $8.08 \pm 2.29$ ,  $1.36 \pm 0.51$  and without stimulation  $2.29 \pm 0.44$ ,  $7.61 \pm 1.0$ ,  $10.96 \pm 0.34$  ( $p \leq 0.05$ ) respectively. For the number of follicles, the treatments were: eCG (500 IU) follicles from 3 to 6 mm  $4.4 \pm 1.5$  and greater than 7 mm  $2.8 \pm 1.9$ ; eCG (750 IU) follicles from 3 to 6 mm  $2.2 \pm 1.3$  and greater than 7 mm  $4.2 \pm 1.8$ ; eCG (1000 IU) follicles from 3 to 6 mm  $3.0 \pm 1.1$  and greater than 7 mm  $7.4 \pm 1.7$  and without stimulation follicles from 3 to 6 mm  $9.2 \pm 1.6$  and greater than 7 mm 1.0 ( $p \leq 0.05$ ) in all treatments. Recovery rate was 42.31%, 50% and 67.86% for the treatments of 500, 750 and 1000 IU of eCG respectively and 50% control group (without eCG) and the category of expanded, compact and stripped COCs in (%) they were: for the eCG treatment (500 IU) 50, 30 and 20; for eCG (750 IU) 61.11, 27.78 and 11.11; eCG (1000 IU) 55.26, 28.95 and 15.79 without stimulation 0, 66.67 and 33.33 ( $p = 0.6576$ ) respectively. In conclusion, the higher the dose of eCG, the greater the follicular growth and with a similar recovery rate.

**Keywords:** Llama, superstimulation, follicle, aspiration, oocyte.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El sistema de la producción de los camélidos sudamericanos se realiza en los altos andes a partir de los 3000 a 4800 msnm, siendo el objetivo principal de su crianza la producción de fibra, donde muchos programas enfocan el mejoramiento de la fibra a través de la introducción de machos superiores y seleccionados con excelente fibra. La aplicación de biotecnologías de reproducción, tales como la inseminación artificial y transferencia de embriones podría rápidamente incrementar el número de animales genéticamente superiores machos y hembras (Miragaya et al., 2005). Entre la técnica de reproducción que se aplica en mejoramiento genético en pequeña escala viene a ser la transferencia de embriones de ovulación única (Pacheco et al., 2016; Perez et al., 2019). La existencia de otras técnicas de reproducción aplicada como la aspiración folicular guiada por ultrasonografía en camélidos, donde los reportes en la literatura son escasos. Pero en camélidos sudamericanos se ha iniciado con trabajos de colección de ovocitos con llamas superovuladas y no superovuladas realizando una colección transvaginal, con el apoyo de equipo ultrasonido, equipado con un transductor lineal de 7.5 MHz (Brogliatti et al., 2000), demostrando que la técnica es factible para recuperar ovocitos como se realiza en la especie vacuna y equina.

Posteriormente continuaron trabajos de investigación donde a las llamas superestimularon con diferentes gonadotropinas y cuando los folículos tenían diámetros mayores a 7 mm administraron una hormona luteinizante, los ovocitos aspiraron con ayuda de un ultrasonido equipado con un transductor convexo con 5 MHz, logrando coleccionar ovocitos en diferentes estados de maduración in vivo (Ratto et al., 2005),



recomiendan los autores que los ovocitos recolectados pueden ser sometidos a una fertilización in vitro.

Finalmente, una investigación realizada donde las llamas fueron superestimuladas con gonadotropinas y al final del tratamiento colocaron hormona sintética de liberación de gonadotropina, posterior a la aspiración folicular apoyado con ultrasonido recuperaron ovocitos maduros y sometieron a la fertilización in vitro, logrando embriones en diferentes estados (Berland et al., 2011), siendo la conclusión de los autores que las gonadotropinas no afectaron la producción de embriones.

El propósito de esta investigación fue probar tres dosis de la gonadotropina coriónica equina para superestimulación del crecimiento folicular en llamas y al final del tratamiento administrarle una dosis de una hormona de liberación de gonadotropinas con los siguientes objetivos 1) evaluar el número de ovocitos en cada dosis, 2) evaluar la categoría a la maduración in vivo de los ovocitos posterior a la aplicación de la hormona sintética de liberación de las gonadotropinas.

## **1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.1.1. Objetivo general**

Obtener el número y categoría de ovocitos por aspiración folicular de los ovarios de llamas (vivas) con estimulación hormonal y sin estimulación.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

Determinar el número de ovocitos de los folículos de los ovarios de llamas estimulados con 3 niveles de tratamiento con la gonadotropina coriónica equina (eCG) posterior a la aspiración folicular por vía transvaginal apoyado por un ultrasonógrafo.



Determinar la categoría de los ovocitos de los folículos de los ovarios de llamas estimulados con 3 niveles de tratamiento con la gonadotropina coriónica equina (eCG) posterior a la aspiración folicular vía transvaginal apoyado por un ultrasonógrafo.



## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

Al superestimular 7 alpacas con 200 mg de FSH divididas en dosis por 3 días, 24 h de finalizado el tratamiento aplicaron 1000 U.I. de Hcg y el tratamiento de 7 alpacas con 1200 U.I. de Ecg y el día 3 aplicaron 1000 U.I de Hcg. La respuesta del ovario, midieron en número de folículos, morfología de los ovocitos aspirados y la proporción de ovocitos madurados. Para la colección de los ovocitos emplearon la técnica quirúrgica de laparotomía en las alpacas, donde realizaron la aspiración folicular con una aguja de 21 G adosado a una jeringa de 20 Ml y reportaron sus resultados: Para el número de folículos mayores a 5 mm 20.0 y 27 para el tratamiento de FSH y Ecg respectivamente; características morfológicas pos aspiración folicular evaluaron como ovocitos con células expandidas, ovocitos con células compactas y ovocitos desnudados de 11.5, 12.5, 1.8 y 8.8, 14.3, 0.1 para los tratamientos de FSH y Ecg respectivamente (Ratto et al., 2007).

En un estudio de colección transvaginal y ultraestructura de los ovocitos de llamas, utilizaron 15 llamas de las cuales a 10 no superestimularon el ovario y a 5 llamas superestimularon con 400 mg de FSH (Folltropin) en dosis divididas por 6 días y el tercer día aplicaron 100 U.I de Ecg. La aspiración folicular en las llamas superestimuladas fue el 6 después haber iniciado el tratamiento y en las llamas no superestimuladas en el estado del desarrollo folicular encontrado. Previamente a la aspiración folicular examinaron los ovarios vía transrectal con un ultrasonógrafo con un transductor lineal rectal de 7.5 Mhz, determinaron el número y diámetro de los folículos. Además, antes de la aspiración folicular en todas llamas aplicaron 2 Ml de lidocaína al 2% vía epidural. La aspiración folicular se realizó con el transductor lineal rectal acondicionado con un mango, el cual



introdujeron por vía vaginal hasta la parte craneal de la vagina y con la otra mano vía rectal manipularon el ovario en dirección al transductor. La aspiración realizaron en los folículos  $\geq 3$  mm con una aguja 20 G de 55 cm de largo a una presión aproximada de 150 mmHg (33 ml/min). Lograron en promedio, en llamas superestimuladas 16.8, 7.7 mm, 9.0 y 52%; en llamas sin superestimulación 4.8, 4.5 mm, 3.1 y 65% de folículos aspirados, diámetro de folículos, ovocitos colectados y tasa de colección respectivamente; en calidad de ovocitos reportaron en categorías, en llamas superestimuladas de 45 colectados, de A=44.4%, B=20%, C=11.1%, D=24.4% y para llamas no superestimuladas de 31 ovocitos colectados de A=38.7%, B=12.9%, C=12.9%, D=22.6% (Brogliatti et al., 2000).

Después de 5 años los investigadores retoman estudios sobre la superestimulación de los ovarios en camélidos sudamericanos, donde reportan sobre la maduración *in vitro* e *in vivo* de ovocitos en llamas. A un grupo de llamas realizaron la ablación de los folículos mayores de 5 mm (aspiración folicular) y a las 48h posteriores, a 18 llamas iniciaron la superestimulación ovárica con 25 mg de FSH por 4 días (2 dosis/día), 36 h después del tratamiento aplicaron 5 mg de LH vía i.m. Mientras que a otro grupo de 17 llamas aplicaron 1000 U.I. de Ecg y a los 4 días posteriores aplicaron 5 mg de LH. En ambos grupos de llamas 22 h después de la aplicación de LH evaluaron por ecografía la respuesta ovárica e inmediatamente realizaron la aspiración folicular vía transvaginal con un transductor convexo con 5 MHz a los folículos mayores a 5 mm y reportaron los siguientes resultados: Número de folículos mayores a 5 mm en sobre el ovario 17.9 y 17.7; tasa de aspiración 71 y 74%; morfología de los ovocitos con células expandidas 8.3 y 10.6, ovocitos con 3 capas de células 2.1 y 0.5, ovocitos desnudados 0.2 y 0.05, ovocitos desnudados 0 y 0.1 y como ovocitos madurados 6.4 y 8.9 para los tratamientos de FSH y Ecg respectivamente (Ratto et al., 2007).



En combinación de la Ecg y GnRH para la superestimulación de los ovarios de llamas y posterior recuperación de los ovocitos emplearon 38 llamas no lactantes, a las cuales sometieron al control de la dinámica folicular con un protocolo a base de benzoato de estradiol y progesterona por 5 días, con la finalidad de suprimir la actividad folicular. Una vez que sacaron los dispositivos de progesterona iniciaron el tratamiento de superestimulación aplicando 3 niveles de Ecg de 500, 1000 U.I. y 1500 U.I a grupos de llamas, 5 días después de la superestimulación le administraron una dosis de 8 ug de GnRH vía endovenosa y 20 h más tarde por la técnica quirúrgica de laparotomía colectaron los ovocitos, reportando los siguientes resultados: las dosis de 500 U.I. de Ecg no provocaron desarrollo folicular, en las dosis de 1000 y 1500 U.I de Ecg reportaron 8.3 y 15.2 folículos >7 mm 5 días después de aplicación de la Ecg; COCs aspirados 6.9 y 12.4; porcentaje de aspiración 83.1% y 81.7% respectivamente (Trasorras et al., 2009).

## **2.2. MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1. Anatomía y Fisiología de los Camélidos Domésticos Hembra**

Los ovarios de las alpacas son de forma irregular (elipsoide y globular) de dimensiones 1.5 – 2.5 x 1.2 x 1 cm (Fowler, 1998). En las alpacas, los folículos ováricos normales miden entre 5 y 12 mm de diámetro, cualquier folículo más grande se considera patológico (Sumar, 1996). Los ovarios presentan pequeños folículos que por palpación no son detectables con facilidad (1 a 3 mm). Los pesos de los ovarios son:  $2,4 \pm 1,3$  g y  $1,9 \pm 1,0$  g en el ovario izquierdo y derecho respectivamente, cuando no contiene el cuerpo lúteo activo, en cuyo caso el peso se incrementa entre un 60 y 100 por ciento. La bursa ovárica rodea completamente al ovario de dimensiones 2.5 x 2.5 x 5 cm (Fowler, 1989).



El tamaño del oviducto es  $20,4 \pm 4,2$  cm, posee las siguientes características: bastante firme, fino y tortuoso y se detectan generalmente con facilidad entre los cuernos uterinos y el ovario dentro de la bolsa ovárica. El útero de los CS tiene dos cuernos separados por un septum y presenta una forma parecida a la letra “Y”. Los cuernos uterinos están suspendidos por el ligamento ancho y en las hembras multíparas el cuerno izquierdo es generalmente más largo ( $7,9 \pm 1,3$  cm) que el cuerno derecho ( $7,4 \pm 0,9$  cm). El cuerpo del útero es relativamente pequeño ( $3,05 \pm 0,71$  cm) de largo y 3 cm de diámetro (Sumar, 1985). Las puntas de los cuernos presentan una terminación redondeada y el oviducto se abre en los cuernos uterinos por un pequeño orificio (papila) el cual actúa como un esfínter bien definido (Sumar, 1996).

El cérvix tiene 2-4 cm de diámetro y presenta dos a tres anillos irregulares en su interior. La vagina de la alpaca mide 13-15 cm de longitud y posee un diámetro de 3,5-5 cm. La vulva es pequeña y corta con una abertura vulvar de 2,5 a 3 cm ventral al ano (Fowler, 1998).

### **2.2.2. Pubertad**

La mayoría de las hembras de camélidos sudamericanos domésticos, manifiestan receptividad sexual entre los 12 y 14 meses, a pesar de haberse evidenciado que la actividad ovárica se da un inicio a edades más tempranas (Novoa y col, 1972; Sumar, 1985).

La iniciación de la pubertad está dada a las condiciones ambientales, especialmente al estado nutricional. Así, la pubertad da inicio cuando la hembra adquiere el 60% del peso corporal de un adulto, así alcanzando a 33-36 kg (Sumar, 1985; Smith, 1985). En algunas veces la primera gestación no se manifiesta hasta los 2 años de edad, siendo la natalidad media de aproximadamente del 50% de hembras



en mención, la mitad de las hembras en algunas veces tienen su primera cría a los 3 años, hasta los 4 años de edad el resto de las hembras no tiene (Fernández-Baca, 1974). Sin embargo, cuando el estado nutricional es adecuado es factible que las hembras presenten su primera gestación a los 12 meses de edad, obteniéndose así una buena fertilidad (Fernández-Baca, 1972; Novoa y col, 1972). Así, se ha evidenciado que las hembras de un año, cuyo desarrollo corporal es bueno, se podría obtener porcentajes de fertilidad del 96.1%, datos similares a las reportados con hembras adultas (Condorena, 1977).

### **2.2.3. Estacionalidad reproductiva**

las llamas y alpacas que se sitúen en su hábitat natural en las alturas del Sur Peruano dan inicio de su actividad reproductiva desde diciembre hasta marzo, debido a que son los meses más cálidos y lluviosos que producen bastante vegetación verde. De manera similar sucede en las comunidades campesinas que mantienen en asociación a sus animales, es decir machos y hembras, todo el tiempo sin hacer distinción en su género (San Martín et al., 1968; Fernández-Baca, 1993).

Sin embargo, parece no tener poco efecto la estación del año, en cuanto a las tasas de ovulación, fertilización y supervivencia embrionaria (Fernández-Baca *et al*, 1992a). también otros autores indican que las alpacas y llamas no tienen la estacionalidad reproductiva definida.

Con respecto a los establecimientos que mantienen a los machos separados de las hembras, estos suelen manejar por conveniencia los mismos meses como época de reproducción de los animales; sin embargo, esta separación de los animales permite que la conducta sexual del macho no se vea inhibida y por lo tanto son activos sexualmente todo el tiempo (Sumar, 1985); generando así que los nacimientos puedan



no solo de forma estacional (San Martín et al., 1968). Aun así, no se sabe cuál es el factor responsable del efecto inhibitorio en el macho, el cual se puede ver atribuido a los cambios de temperatura, humedad, luz, suplementos alimenticios, estímulos visuales u olfatorios; siendo el más importante el manejo y el tipo de crianza. Pese a todo esto, debemos tener en cuenta que la conducta sexual, tasa de ovulación, fertilización y sobrevivencia embrionaria es indistinta a lo largo del año, tanto en los 8 meses establecidos para época de reproducción como en los que no (Fernández-Baca et al., 1972).

#### **2.2.4. Onda folicular en camélidos**

Los camélidos sudamericanos tienen la característica de poseer una actividad ovárica que ocurre en ondas de crecimiento y regresión folicular; es decir, la onda folicular presenta fases de emergencia, selección, crecimiento, estática y regresión. Se indican periodos variables de la onda folicular en llamas que van desde 12 hasta 24 días (Tibary, 2017).

Los patrones del desarrollo folicular en llamas en ausencia de un estímulo de ovulación se caracterizan por ser continuas con ondas sobrepuestas (over lapping) entre ellas, con duraciones de 20 días, determinado por vía transrectal y de 22.5 días por vía transvaginal (intervalo inter onda) (Uri Pérez et al., 2021). Datos que difieren a los reportados por Bravo et al. (1990) con similitud en la mayoría de estudios en llamas (Adams et al., 1990; Chaves et al., 2002; Cavilla et al., 2013). Estas ondas corresponden a la renovación continua en el desarrollo de folículos, tal y como ha sido reportado en estudios en alpacas, vicuñas y guanacos (Vaughan, 2001; Miragaya et al., 2004; Riveros et al., 2010; Hanco et al., 2015). La variabilidad en la duración del intervalo inter onda en las llamas evaluadas se debe a que mientras un FD está en



fase de regresión, otro grupo de folículos está desarrollando para convertirse en el nuevo FD. Este fenómeno provoca que las hembras sean receptivas la mayor parte del tiempo (Bravo et al., 1990; Cavilla et al., 2013; Vaughan y Tibary, 2006).

La onda folicular se inicia con el desarrollo de folículos reclutados. En este caso, el N° de folículos/cohorte fue de 5.21 y 6.38 para las evaluaciones vía transrectal y transvaginal respectivamente ( $p=0.0011$ ). Mediante el uso del transductor endocavitario transvaginal se pudo observar un mayor número de folículos dado su mayor área de contacto, imágenes más amplias y de mayor calidad (Uri Perez et al., 2021). Estos datos difieren a otros reportes que indican entre 8 a 10 folículos/cohorte de 2 a 3 mm en llamas y alpacas (Adams et al., 1990; Vaughan et al., 2004). El desarrollo de folículos pequeños está asociado a un aumento y disminución inmediata de FSH, en tanto que el número de folículos reclutados depende del tamaño de la reserva ovárica, por lo menos en el bovino (Adams et al., 1992; Cushman et al., 1998). Sin embargo, no se dispone de información precisa sobre la secreción de gonadotropinas durante las ondas foliculares en camélidos sudamericanos.

El diámetro máximo del folículo fue de 12.49 mm para la ecografía transrectal y de 13.56 mm para ecografía transvaginal, sin diferencias significativas entre estos procedimientos. (Uri Perez et al., 2021). Valores obtenidos que superaban ligeramente a otros reportes (Bravo et al., 1990; Chaves et al., 2002; Cavilla et al., 2013) con similitud al reporte de Adams et al. (1990).

Algunas características como alternancia del funcionamiento ovárico, siendo de 52.6% para el ovario derecho y 47.4% para el izquierdo; la presencia de folículos de mayor tamaño ( $>20$  mm) con relación al total de folículos dominantes fue de 10.5%, y la sobreposición de ondas foliculares estuvo presente en 36.8% del total de



ondas evaluadas. Asimismo, el 10.5% de las ondas tuvieron un comportamiento de codominancia (crecimiento de dos folículos diferenciados de los demás al mismo tiempo) (Uri Perez et al., 2021). También fue reportado esta característica en otras investigaciones en camélidos (Bravo et al., 1990; Chaves et al., 2002; Vaughan, 2011; Cavilla et al., 2013; Hanco et al., 2015).

### **2.2.5. Ovulación**

Este mecanismo endocrino se refiere a un proceso de ruptura de la pared folicular y luteinización del folículo preovulatorio y la expulsión del ovocito para que llegue a la a ser fecundado. En rumiantes es debido al pico preovulatorio de LH constituido por una retroalimentación positiva del estradiol (E2) a nivel del hipotálamo, que es estimulado a su vez una mayor liberación de la GnRH hacia la hipófisis, con lo cual genera mayor liberación de gonadotropinas. A la pre ovulación la membrana basal del folículo ovulatorio empieza el adelgazamiento y desintegración, por lo cual la teca y granulosa sufren un proceso de separación. Por último, se reorganizan estas células, de tal manera que se da la formación de pequeñas células luteales y las células luteales grandes respectivamente formándose el cuerpo lúteo, encargado de la liberación de progesterona (Senger. 2005).

La inducción de la ovulación en los camélidos sudamericanos se hizo estudios a través de la aplicación de hormonas exógenas, que administrando por vía parenteral de 1000 U.I. de Hormona Corionica Humana (hCG), determinaron que la ovulación se produce a las 24 horas post aplicación (San Martin et al., 1968), la administración de 8 ug de buserelina vía intramuscular (Bourke et al., 1992) y de 2 a 5 mg de LH (Taylor et al., 2000), inducen la ovulación a las 30 horas post aplicación aproximadamente.



El mecanismo de ovulación en los camélidos se inicia con la intromisión del pene durante la cópula que por vía refleja inicia la ovulación desencadenando la secreción endocrina, que se relaciona con los niveles de LH y la ovulación siguiente, donde picos de LH se incrementan a los 15 min, continúan estos picos hasta las 2 h y declinan 7 h después de la monta (Bravo, 1990).

Se reportaron ovulaciones espontáneas de 5%, habiéndose encontrado con mayor frecuencia durante el postparto. A un no se conocen los mecanismos por el cual se producen, pero se reportan que los causantes de cuyo fenómeno son los estímulos físicos, auditivos, olfatorios o visuales (Fernandez-Baca, et al., 1970b).

En alpacas y llamas se determinó que el folículo dominante  $\geq 7$  mm es el tamaño mínimo para que ocurra ovulación. Cuando se tubo folículos pequeños (4 a 6 mm) hubo un incremento ligero en los niveles plasmáticos de LH (29.1 21 ng/mL/h) luego de la cópula, pero no ovularon. Los folículos en fase de crecimiento, estática y regresión (7 - 12 mm) tuvieron una mejor descarga de LH (62.4, 55.1, 63,7 ng/mL/h respectivamente). Además, se determinó que las llamas tengan mayor liberación de LH post-cópula comparado con la alpaca. Por el contrario, las concentraciones de FSH no fue afectado por la cópula que tuvo un promedio de 0.96 ng/mL en niveles plasmáticos. Otro dato de este experimento fue que los folículos que estaban en regresión llegaron a luteinizarse, mas no ovular. Esta estructura luteal formada tuvo una vida media de 5 días, por lo tanto, hubo un retraso del inicio de un nuevo folículo dominante de 5 a 7 días (Bravo et al., 1991).

#### **2.2.6. Superovulación**

La superovulación consiste en inducir el crecimiento, maduración y ovulación de un gran número de folículos simultáneamente (Miragaya et al. 2005). Para obtener



la superovulación es necesario comenzar con tratamiento hormonal en la ausencia de folículos mayores a 7 mm (folículo dominante) (Bourke et al., 1995). Sin embargo, la respuesta a estos tratamientos es variable, lo cual se transforma en una falta de previsibilidad y constituye uno de los factores limitantes de la técnica (Looney, 1986; Hahn, 1992).

### **2.2.7. Hormonas para provocar superovulación**

En los camélidos la superovulación consiste en administrar glicoproteínas con funciones de FSH y LH como la gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropinas folículo estimulante de origen porcina (pFSH) (Miragaya et al., 2005).

Para iniciar la superovulación en camélidos se siguen diferentes protocolos y que la inducción de superovulación debe de iniciarse en la primera fase de la onda folicular (crecimiento folicular) y para obtener esta emergencia folicular los autores aplicaron diferentes estrategias como:

#### **2.2.7.1. Superovulación en la fase luteal natural**

Al folículo dominante se le induce la ovulación administrando gonadotropina coriónica humana (hCG) o un análogo de la gonadotropina de liberación de las gonadotropas (GnRH); a los 7 días post ovulación se 1000 U.I. de gonadotropina coriónica equina (eCG) y el día 9 se administra PGF2 $\alpha$  para inducir la luteólisis (Bourke et al., 1992).

#### **2.2.7.2. Superovulación en una fase luteal inducida**

La progesterona administrada en llamas aparentemente inhibe el desarrollo folicular temporalmente y de esta forma se inicia una nueva onda folicular aproximadamente 7 días después de haber iniciado el tratamiento (Alberio y Aller,



1996; Chaves et al., 2002). Este tipo de tratamiento genera una fase luteal inducida (artificial) se pueden utilizar diferentes dispositivos vaginales que contengan progesterona y liberen por el espacio que dure el tratamiento o también se pueden utilizar implantes de progesterona. En llamas con implantes insertados deben permanecer por un periodo de 7 días y administrar 1000 U.I. de eCG respondiendo con el crecimiento de 6.1 de folículos (Bourke et al., 1992). Con el mismo protocolo, pero aplicando un dispositivo intravaginal CIDR resulta con la misma proporción del crecimiento folicular (Bourke et al., 1992). De forma parecida insertando el dispositivo CDR en llamas por 5 días y administrando 500 U.I. de eCG al final del tratamiento con la extracción del dispositivo se logra un crecimiento promedio de 5.2. folículos (Chaves et al., 2002). Con el mismo protocolo de sincronización de la onda folicular donde se le administro 500 U.I. de eCG y adicióno la administración de pFSH (500 mg) por 4 días en dosis decrecientes, provocaron un crecimiento de 5.9. folículos en llamas (Agüero et al., 2001). Realizando una variación en el mismo protocolo en llamas con la administración de una inyección de benzoato de estradiol al inicio del tratamiento y permaneciendo por 8 días el CDR y administrando al momento de sacar el dispositivo vaginal 1200 U.I. de eCG desarrollaron 4.2 folículos (Aller et al., 2002b).

### **2.2.7.3. Superovulación con el inicio de la onda folicular**

La técnica consiste en realizar un seguimiento ecográfico diario al folículo dominante hasta determinar un tamaño menor a 7 mm, luego es iniciar la superovulación administrando gonadotropinas (Aller et al., 2002; Carretero et al., 2010; Trasorras et al., 2009).



Miragaya et al. (2006) reportaron que iniciar el tratamiento en presencia de un folículo mayor a 5 mm induce el crecimiento de ese único folículo.

#### **2.2.7.4. Superovulación con sincronización de la onda folicular por ablación**

Es un método mecánico, en donde se realiza la aspiración de todos los folículos mediante ultrasonografía transvaginal, lo que resulta en el comienzo sincrónico de una nueva onda folicular 1,5 días más tarde (Bergfelt et al., 1994). La ablación folicular es un método eficaz para sincronizar la onda folicular y se comienza el tratamiento superovulatorio 1,5 a 2 días después (Bergfelt et al., 1997), pero tiene como desventaja que se requiere de un equipo sofisticado (ecógrafo con transductor micro convexo, bomba de vacío, etc.) y además de una persona con los conocimientos necesarios para llevar adelante la técnica.

En llamas al realizar la aspiración o ablación de los folículos  $\geq 5$  mm permite una sincronización de la onda folicular con una nueva emergencia después de 2 días después de la aspiración del folículo dominante (Ratto et al., 2003).

#### **2.2.7.5. Superovulación con sincronización de la onda folicular por ruptura manual**

La ruptura manual del folículo dominante en forma manual también es un método para sincronizar el inicio de una nueva onda folicular y el tratamiento se inicia inmediatamente a la ruptura folicular (Sansinena et al., 2003, 2007).

#### **2.2.8. Maduración in vivo del ovocito (ovulación)**

Durante el proceso de ovulación el ovocito madura y con la ovulación culminada se obtiene un ovocito maduro, también denominado ovocito en metafase II u ovulo maduro. La ovulación se inicia con la regresión del cuerpo lúteo, decrecimiento de los niveles de progesterona y la elevación de los niveles de



estrógenos por secreción del folículo, pero-ovulatorio, donde estos estrógenos estimulan las secreciones de grandes cantidades de GnRH (hipotálamo) y que a la vez estimulan en la hipófisis oleadas de grandes volúmenes y frecuencia de LH. Las oleadas de LH promueven el crecimiento final del folículo preovulatorio a un tamaño de folículo de ovulación. Con el máximo tamaño del folículo, de secreción de estrógenos altos e inhibina se despliega el comportamiento del celo en la hembra y la culminación de la ovulación del folículo pre-ovulatorio resulta en la liberación del ovocito maduro listo para la fertilización (Whitfield, 2018).

Durante las oleadas de LH a través de varios procesos actúa sobre los ovocitos que están dentro los folículos terciarios (folículo pre-ovulatorio), que están detenidos en la primera meiosis metafase I en estado de profase I, debido a que las células de la granulosa secretan altos niveles de adenosina monofosfato (cAMP), responsable de inhibir la actividad de factor de maduración del ovocito (MPF). Para la maduración del ovocito en cada ciclo reproductivo (celo de la hembra se tiene un folículo preovulatorio), sobre este folículo actúan las oleadas de la hormona luteinizante (LH) que reduce la actividad de secreción de las células de la granulosa el cual conduce a la disminución del cAMP y a la vez se incrementa el factor de maduración del ovocito (MPF) que reinicia la meiosis terminado en la maduración del ovocito en metafase II u ovulo maduro y el evento concluye con la ovulación (Straczynska et al., 2021). Las oleadas de LH al inicio del celo en la hembra reinician la meiosis induciendo la maduración del ovocito (Jianzhen et al., 2015).

#### **2.2.9. Función de la GnRH análogo en la maduración in vivo de los ovocitos**

Los análogos de GnRH administrados en las hembras en celo inducen a la liberación de la hormona luteinizante (LH) suficiente para desencadenar la



ovulación. Consecuentemente como agente farmacológico produce una alteración en la secreción de FSH y LH, esta variabilidad de respuesta entre animales se debe al estado fisiológico y el tiempo de aplicación como en el celo, preñez o post parto (Thatcher et al., 1993; Picard-Hagen et al., 2015). Los pulsos de LH iniciados antes de la ovulación, donde los ovocitos dentro los folículos terciarios están detenidos en la primera meiosis en estado de profase I, debido a que las células de la granulosa secretan altos niveles de adenosina monofosfato (cAMP), responsable de inhibir la actividad de factor de maduración del ovocito (MPF). Para la maduración del ovocito en cada ciclo reproductivo (celo de la hembra se tiene un folículo preovulatorio), sobre este folículo actúan las oleadas de la hormona luteinizante (LH) que reduce la actividad de secreción de las células de la granulosa el cual conduce a la disminución del cAMP y a la vez se incrementa el factor de maduración del ovocito (MPF) que reinicia la meiosis terminado en la maduración del ovocito en metafase II u ovulo maduro y el evento concluye con la ovulación (Straczynska et al., 2021). Las oleadas de LH al inicio del celo en la hembra reinician la meiosis induciendo la maduración del ovocito (Jianzhen et al., 2015). La ovulación y en el tiempo seguido a GnRH en el inicio del estro influencia la liberación de LH, el pulso de LH frecuente, incrementa la progesterona y subsecuentemente las concentraciones de progesterona (Fields et al., 2009).

#### **2.2.10. Acción de la hormona coriónica 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. Esta hormona es una glucoproteína presente en



grandes cantidades en el suero de yegua entre los días 46 y 130 de gestación y presenta en una misma molécula actividades biológicas propias de la FSH y de la LH (Papkoff, 1978; González-Mencio y col, 1978). Los preparados comerciales se obtienen a partir de la purificación del suero recogido a yeguas gestantes y su posterior liofilización. Su potencia se expresa en unidades internacionales, siendo la actividad gonadotrófica específica de 1 UI igual a 0,25 mg de una preparación estándar mantenida por la Organización Mundial de la Salud. La molécula está compuesta por dos subunidades una  $\alpha$  y otra  $\beta$ . La primera es la responsable de las actividades FSH y LH, mientras que la subunidad  $\beta$  determina la amplitud de su actividad. El alto contenido en ácido siálico de la molécula de eCG le confiere una larga vida media, que supera ampliamente a las de la FSH y la LH. Su vida media se cifra en torno a las 40 horas, aunque puede llegar a persistir hasta 10 días (Schams y col, 1978). Esto permite inducir la respuesta superovulatoria con una única administración, habiéndose demostrado que las administraciones múltiples no mejoran la tasa de ovulación (Hafez y col, 2002).

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 12,8,4 folículos y 8,1 cuerpos lúteos, mientras que en las alpacas solamente se desarrollaron 7,5 folículos y 5,9 cuerpos lúteos (Huanca y col, 2006). 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 y col, 1999). El empleo de dosis superiores determina



un considerable incremento de la frecuencia de aparición de folículos quísticos (Bravo y col, 1995c).

### **2.2.11. Morfología del ovocito maduro**

La maduración del ovocito de bovino es entre 24 a 26 horas para pasar de ovocito I a ovocito II, por el reinicio de la meiosis (Gordo et al., 2001). A las 9-12 horas después del pico de LH la membrana nuclear se rompe; 15 horas después del pico de LH el número y tamaño de las gotas lipídicas se incrementan y las mitocondrias se colocan alrededor de las gotas lipídicas y en este conglomerado tienden a distribuirse a través del citoplasma, numerosos ribosomas han aparecido especialmente alrededor de los cromosomas y la cantidad de aparatos de Golgi han decrecido; el ovocito en metafase II (ovulo maduro) esta aproximadamente a las 24 horas después del pico de LH la gran cantidad de gránulos corticales son distribuidas en la periferia del citoplasma, las gotas lipídicas y las mitocondrias se unen más en la parte central del citoplasma, en la zona periférica se tiene grandes cantidades de retículo endoplasmático liso, los aparatos de Golgi están ausentes y finamente se expulsa el segundo corpúsculo en el espacio perivitelino y así es liberado el ovocito maduro u ovulo durante la ovulación y está listo para la fertilización (Hyttei et al., 1997).

### **2.2.12. El folículo**

Es la unidad estructural y funcional de los ovarios. La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular, abarca desde un estadio de folículo primordial hasta el folículo preovulatorio (Gigli, Russo, & Agüero, 2006). Los folículos se clasifican en primordiales, primarios, secundarios y terciarios de acuerdo a las características histológicas de



las células de la granulosa que rodean al ovocito y al grado de maduración del mismo, en la vida fetal se produce la diferenciación de los folículos primordiales y secundarios debido a que la primera activación folicular es en principio dependiente de factores de crecimiento, mientras que la activación de los folículos terciarios ocurre en forma de ondas y es gonadotrópica dependiente. Varios folículos comienzan a crecer simultáneamente hasta que uno de ellos se diferencia en dominante y los demás se atresian o inhiben su desarrollo (Gigli, Russo, & Agüero, 2006).

### **2.2.13. Aspiración folicular**

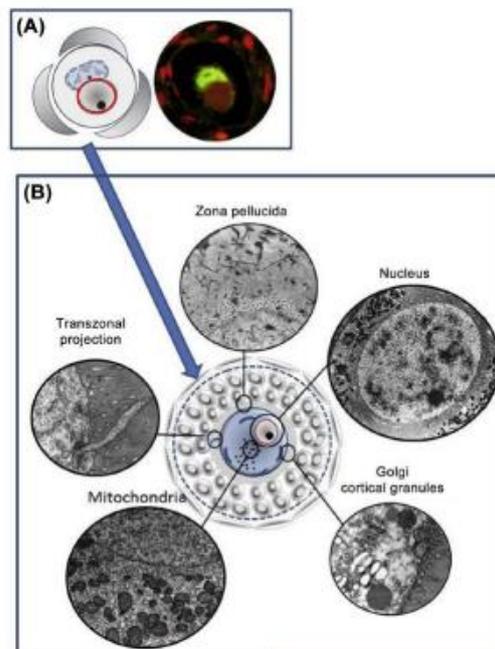
La aspiración folicular es una técnica desarrollada en humanos que consiste en realizar la aspiración folicular percutánea guiada por ultrasonografía (ecógrafo) bajo anestesia local y ofrece una alternativa atraumática y económica; método para la recolección de ovocitos para la fertilización in vitro (Lenz and Glen, 1982). La aspiración transvaginal folicular en vacas se inició en 1988, donde a la vaca se vacía las heces, se higieniza la región perianal, se le coloca un tranquilizante por vía endovenosa, además una anestesia epidural de 5 mL al 2%, se coloca al animal dentro un brete para evitar su movimiento. Un ultrasonido con transductor sectorial vaginal es usado con una frecuencia de 5 MHz, a lo largo del eje del transductor se coloca un soporte con canal 50 cm de largo, que sirve de guía para la una aguja (0.8 a 10 mm de diámetro), a la aguja se conecta una línea de aspiración y es conectada a una bomba de aspiración de 30 a 40 mL por un minuto. El operador guía al transductor armado por la vagina y con la mano que está en el recto retrae el ovario frente al transductor y que se visualiza al folículo como un cuerpo redondo y anecogénico, se punza con la aguja y al mismo tiempo

se succiona con la bomba se aspiración, recolectando el fluido folicular dentro un vial, así sucesivamente los demás folículos, finalmente en el laboratorio se observa la presencia de los ovocitos (Pieterse et al., 1988).

#### 2.2.14. El Ovocito

Los ovocitos son distintos a otras células del organismo, poseen la capacidad de convertirse después de la fecundación en célula totipotente. En diferentes tipos de mamíferos existen ajustes en el tiempo de desarrollo del ovocito. Sin embargo, conservan los procesos básicos que gobiernan la diferenciación celular, fertilización y embriogénesis (Plant & Zeleznik 2015). Con respecto a la estructura del ovocito, los estudios de microscopía electrónica definieron en gran medida la distribución de los orgánulos desde la línea germinal (Figura 1) hasta el desarrollo del embrión (Nicosia et al., 1977).

**Figura 01.** Estructura del ovocito.



(A) representa la organización general de los orgánulos en un folículo primario; El diagrama esquemático (izquierda) indica el núcleo centralizado y la agregación de orgánulos conocidos como el



cuerpo de Balbiani (asterisco). La derecha es una micrografía de inmunofluorescencia que ilustra la concentración del marcador específico de células germinales VASA dentro del cuerpo de Balbiani (verde) ubicado al lado del núcleo del ovocito (rojo). Tras la activación, los ovocitos entran en la fase de crecimiento de la ovogénesis (B). (B) resume las principales características ultraestructurales de un ovocito en crecimiento dentro de un folículo pre antral observando el ensamblaje de la capa extracelular o zona pelúcida, el núcleo agrandado o la vesícula germinal con nucléolos prominentes (NO), complejos de Golgi subcorticales con gránulos corticales asociados, abundante perinuclear mitocondrias y la elaboración de microvellosidades en la membrana plasmática de los ovocitos que interactúan con las proyecciones de células somáticas conocidas como procesos trans zonales (Plant & Zeleznik 2015).

#### **2.2.14.1. Evaluación morfológica del ovocito**

##### **A. Complejo cúmulo-ovocito (COC)**

Se evalúa los COC mediante un sistema de puntuación sobre la expansión del cúmulo, se ha encontrado que una alta densidad del cúmulo se relaciona con una disminución en la madurez del ovocito. Además, la presencia de coágulos sanguíneos se asocia con una granulación central densa y tiene un efecto negativo sobre la tasa de fertilización (Thomas Ebner et al. 2008).

##### **B. Zona pelúcida**

Los criterios de evaluación de la zona pelúcida son: oscurecimiento, grosor, birrefringencia y cambios estructurales. Se cree que el oscurecimiento de la Zona pelúcida no influye en la tasa de fertilización, calidad del embrión y tasa de implantación. La Zona pelúcida delgada se relaciona con alta tasa de fertilización. La alta birrefringencia se relaciona con la calidad del ovocito y una baja birrefringencia se relaciona con mayor tasa de abortos espontáneos. La



Zona pelúcida fragmentada se considera. inadecuada para el tratamiento de ICSI (Loutradis et al. 1999).

### **C. Espacio perivitelino**

Los criterios de evaluación más importantes del espacio perivitelino son: tamaño y la presencia de gránulos. Aumento de tamaño en el espacio perivitelino se asocia con una baja tasa de fertilización, pero con una mejor calidad embrionaria. La presencia de gránulos gruesos en el espacio perivitelino se asocia con baja tasa de implantación y de embarazo (Rienzi et al. 2008).

### **D. Morfología del primer cuerpo polar**

Los criterios de evaluación más importantes en la morfología del primer cuerpo polar (PB1) son: fragmentación, tamaño y superficie. El PB1 grande o degenerado se relaciona con tasas de fertilización disminuida, pero no se mostró ninguna correlación en la morfología pronuclear o de la calidad del embrión. La superficie rugosa, fragmentada o agrandada se correlaciona con una baja tasa de fertilización/calidad del embrión (Navarro et al. 2009).

### **E. Forma del ovocito**

Los criterios de evaluación más representativos en la morfología del ovocito son: la forma y el tamaño. Los ovocitos ovoides se relacionan con un retraso en la implantación (Ebner et al. 2008). Los ovocitos de gran tamaño se relacionan con mayor probabilidad de obtener embriones triploides a pesar de su desarrollo in vitro normal (Balakier 2002).



## **F. Apariencia del citoplasma**

Los criterios de evaluación más importantes en la apariencia del citoplasma son: color y granulación. Los ovocitos con citoplasma oscuro se relacionan con embriones de menor calidad. Granulación periférica difusa en el citoplasma se relaciona con morfología pronuclear alterada. Sin embargo, en otro estudio se observó que cualquier tipo de granulación en el citoplasma se asocia a alta tasa de fertilización en comparación a los ovocitos con ausencia de gránulos (Wilding et al. 2007).



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ÁMBITO EXPERIMENTAL

El trabajo de investigación se realizó en las instalaciones pertenecientes al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, a una altitud de 3824 m con 15°49'20.4" latitud Sur y 70°01'07.3" longitud Oeste, con una temperatura ambiental que oscila de -2 a 20 °C y una humedad relativa que varía entre 36 a 55%. (SENAMHI, 2019).

#### 3.2 ANIMALES

Para el estudio se utilizaron 28 llamas hembras adultas con edades entre 4 a 7 años, multíparas, sin crías en pie y con estado corporal media de 2.8 (Australian Alpaca Association, 2008). Los animales utilizados fueron provenientes del CIP-LA RAYA. La distribución de las llamas se hizo de la siguiente manera:

**Tabla 1.** Distribución de las llamas para la superestimulación de los Ovarios y colección de ovocitos con diferentes cantidades de eCG.

500 U.I. Ecg (n=7)	750 U.I eCG (n=7)	1000 U.I. eCG (n=7)	Control sin eCG (n=7)
Número de ovocitos y categoría	Número de ovocitos y categoría	Número de ovocitos y categoría	Número de ovocitos y categoría

#### 3.3. MANEJO DE LOS ANIMALES

Las llamas fueron alimentadas con pastos naturales y cultivados existentes en la ciudad universitaria y suplementados con heno de avena todos los días, agua *ad libitum*, pernoctando en cobertizos y corrales.



El estudio se realizó en la época reproductiva del 2020.

### **3.4. DURACIÓN DEL ESTUDIO**

El estudio se realizó desde 1 de marzo del 2020 hasta el 20 de junio del 2020.

### **3.5. METODOLOGÍA**

#### **3.5.1 Preparación de los animales**

La sujeción y preparación de las llamas se realizó tomando las referencias de Hanco et al. (2015).

Cada uno de los procedimientos que se describen a continuación fueron aplicados antes de iniciar las evaluaciones ultrasonográficas, ablación folicular y aspiración folicular transvaginal (OPU) como corresponde a cada técnica empleada.

- Días previos a la ejecución del trabajo las llamas fueron entrenadas al flujo de manejo (etapa de acostumbramiento) como el ingreso al área de espera luego a área de ecografías.
- Se ingreso a una llama al área de ecografía en donde se hizo la sujeción y la inmovilización con el uso de 2 sogas de 2.5 metros amarrándoles las extremidades posteriores y anterior hacia su cuerpo quedando así el animal en el piso en posición de cubito ventral, enseguida se cubrió los ojos con una venda.
- Se le subió a una camilla a la llama para poder subirla con facilidad a la mesa de exploración para la evaluación ultrasonográfica, enseguida fueron aseguradas con fijadores (correas), estos diseñadas para los camélidos domésticos.



- Luego se introdujo en el recto una mano izquierda enguantada y lubricada con mucilago de lino (linaza), la mano en forma de cono y se evacuo suavemente el contenido fecal con los dedos.
- Enseguida se procedió a la higienización de la región perineal y órganos genitales externos con agua y jabón carbólico y papel toalla.
- Se deposito mucilago de lino en el recto para luego también introducir el transductor lineal para realizar la evaluación ultrasonográfica de los ovarios. Fue replicado en cada llama todos estos procedimientos.
- Para la realización de la ablación folicular o aspiración folicular previamente se higienizo con agua, jabón carbólico y se desinfecto con clorhexidina al 2% la zona perineal y genital externo antes de la introducción del transductor micro convexo endocavitario por vía vaginal.

### **3.5.2. Evaluación de la estimulación Ovárica**

#### **Sincronización de la emergencia folicular.**

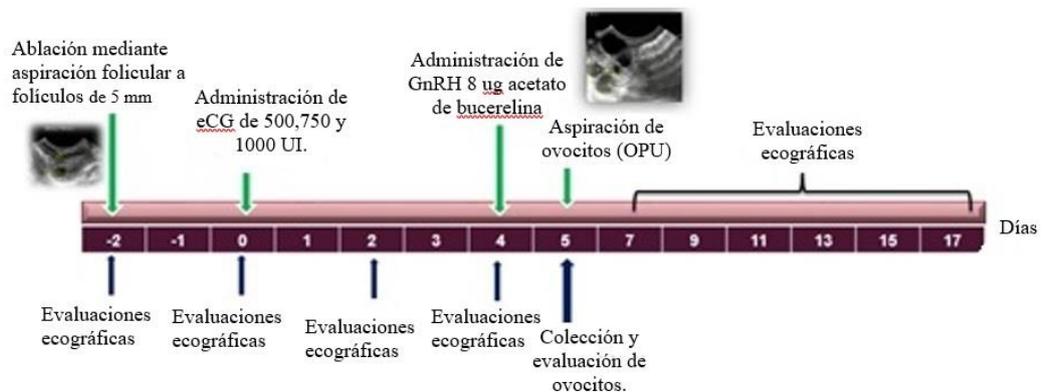
- Las llamas fueron colocadas en posición decúbito ventral sobre una mesa de exploración, luego fueron fijadas con correas diseñadas para los camélidos domésticos.
- Enseguida se aplicó la anestesia epidural baja (lidocaína al 2%) en una dosis de 2.5 ml.
- Luego la evacuación de heces e higienización perineal y genitales externos descritas ya anteriormente.
- Posteriormente se procedió a realizar la ablación folicular (fue considerado como el día -2 antes de aplicar los protocolos. Ver Figura 01) que consistió en la aspiración de los folículos  $\geq 5\text{mm}$  con la finalidad de sincronizar la

emergencia de la onda folicular siguiente, con una guía de ultrasonido transvaginal en modo B a 6.5 MHZ (Sonostar SS8®) y una aguja de 20Gx1.5” según recomendación de diversos autores (Berland et al., 2011; M. H. Ratto et al., 2003; Santi Quispe, 2018).

### 3.5.3. Protocolo de multi ovulación a diferentes dosis de eCG.

A las 48 horas después de la ablación folicular se realizó el monitoreo de los ovarios, observándose el inicio de una nueva onda folicular, en ese momento fue aplicado (día 0) la Gonadotropina coriónica equina (eCG:Novormon®) en tres dosis de 500, 750 y 1000 unidades internacionales (UI) por cada animal la administración de la hormona fue por vía intramuscular (IM.), haciendo una previa distribución al azar de 7 llamas por cada tratamiento. (Ratto *et al.*, 2005).

**Figura 02.** Protocolo de tratamiento hormonal usado.



**Día -2** (indica dos días antes de la administración de eCG) Se realizó la evaluación ovárica por vía transvaginal y la aspiración de los folículos (ablación) mayores de 5 mm,

**Día 0:** Se administro la hormona gonadotropina coriónica equina (eCG) de acuerdo a los tratamientos: T1: 500 UI, T2: 750 UI, T3: 1000 UI por vía intramuscular.



**Día 4:** después de las evaluaciones ecográficas cuando los folículos se encontraron con un tamaño mayor a 7 mm, se les administró a las llamas la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) Sintética, con una dosis de 8 ug (2ml) por vía endovenosa (vena yugular).

**Día 5:** después de 22 horas de administración de GnRH se realizó la colección de ovocitos por aspiración folicular (OPU) (Ratto et al., 2005; Trasorras et al., 2009).

#### **3.5.4. Morfometría ultrasonográfica folicular.**

La evaluación de las características morfométricas foliculares se realizó mediante el monitoreo ecográfico trans rectal de ambos ovarios, en días alternos para lo cual se usó un ecógrafo Sonostar SSR® (Sonostar Technologies, China) equipado con un transductor lineal rectal E7140 a una frecuencia de 6.5 MHz. Las imágenes se analizaron en modo 2B, y fueron almacenados en el equipo para la observación de las estructuras morfométricas siguientes:

- **Nº de folículos;** fue registrado aquellos folículos con diámetros entre 2 y 3 mm (día 0) a los dos días posteriores de la ablación folicular, también al momento de la aspiración folicular contabilizando el número total de folículos presentes en cada ovario.
- **Diámetros foliculares;** fueron evaluados midiendo por el interior de las paredes de los folículos de diversos diámetros al momento de aplicación de la eCG y antes de iniciar con la aspiración folicular.
- **Tasa de crecimiento;** se determinó en mm/día, resultado que se obtuvo de la diferencia de los diámetros obtenidos en cada tratamiento el día de aspiración folicular menos los diámetros obtenidos el día “0” dividido entre seis que fue el tiempo de duración del proceso de crecimiento folicular.



### 3.5.5. Aspiración folicular transvaginal u ovum pick up (OPU).

El proceso de la aspiración folicular se realizó con un equipo ultrasonográfico Sonostar SS8® equipado con un transductor micro convexo transvaginal a 6.5 MHz en modo B.

- Se alisto todos los materiales de aspiración sobre una mesa en donde se ubican los materiales principalmente los tubos de colección de 50 ml en una caja de Tecnopor con agujeros en la tapa en donde fueron colocadas los tubos y con agua atemperada a 37.5 °C (ver anexo)
- El transductor micro convexo endocavitario fue mantenido sumergido en solución de gluconato de clorhexidina al 2% desde el inicio hasta el fin del procedimiento excepto en momentos de la aspiración folicular.
- La llama fue colocada sobre la mesa y sujetadas con 2 correas quedando así en posición decúbito ventral.
- Enseguida fue administrado una anestesia epidural (sacro coxígeo) con 3 ml de lidocaína al 2% con el uso de una aguja de 21 G x 1.5” y una jeringa de 5 ml.
- Luego de realizado el lavado y higienización de la zona perianal y genitales externos con agua, jabón carbólico y clorhexidina al 2%
- Se procedió a introducir la mano izquierda enguantada por el recto luego se introdujo el transductor micro convexo por la vaginal situándose en el fómix.
- Con la mano izquierda ubicado en el recto se sujetó al ovario entre los dedos posicionando al ovario contra la superficie del transductor para la ubicación de los folículos visualizándose a través del monitor del ecógrafo.
- Se registro las características morfométricas foliculares.



- Una vez ubicado los folículos visualizándose en la imagen del ecógrafo, se introdujo por el guiador (tubo de aluminio) la aguja de 20 G x 1.5” adosada a una línea de colección (manguera de silicona de 3 mm de diámetro) y la guía de aguja (tubo de acero inoxidable).
- La punta de la aguja estuvo en dirección del folículo, se realizó la punción respectiva (atravesando la pared de la vagina), aspirando el líquido folicular hacia un tubo falcon de 50 ml, para cuya aspiración se usó una bomba de vacío con un flujo de 22 ml/minuto.
- Al cabo de la aspiración se retiró la línea de colección con su aguja del guiador para succionar la solución de aspiración (PBS suplementado) con la finalidad de lavar el líquido retenido en la línea de colección.
- Finalmente fue trasladado al laboratorio todo el contenido aspirado para el lavado y la evaluación de los COCs.

### **3.5.6. Solución para aspiración**

La preparación fue de la siguiente manera:

La Solución Buffer Fosfatada (PBS) suplementado con 1% de suero fetal bovino (SFB) + 10 U.I. de heparina/mL+ 25 ug/mL de gentamicina. (Berland et al., 2011; Santi Quispe, 2018).

### **3.5.7. Evaluación de los ovocitos y tasa de recuperación.**

La tasa de recuperación se obtuvo del número de ovocitos obtenidos por animal sobre el número de folículos que fueron aspirados multiplicado por 100 para la interpretación porcentual cuya formula fue:

$$\text{Tasa de recuperacion} = \frac{\text{Numero de ovocitos obtenidos}}{\text{Numero de foliculos aspirados}} \times 100$$



La evacuación de los COCs se realizó según la recomendación de (Ratto et al., 2007).

- El contenido de los tubos Falcon de la aspiración (fluido folicular + COCs) fue vertido a un filtro de Emcon de 80  $\mu$ m de malla, en donde se lavaron por tres veces con solución PBS.
- El medio limpio complejo cumulo ovocito (COCs) fue vertido en una placa Petri enseguida se llevó a un microscopio estereoscópico para la búsqueda, selección y evaluación de los COCs. El procedimiento fue realizado sobre una platina térmica a 38 °C
- Con ayuda de una micropipeta se trasladaron cuidadosamente los COCs a otra placa Petri que contenía 3 mL de PBS + 10% SFB para realizar el conteo, evaluación y categorización de los ovocitos.
- Los ovocitos para la categorización se clasificaron de acuerdo a sus características morfológicas teniendo en cuenta el número de capas de células del cúmulo, categorización empleada por Ratto et al. (2007), siendo la siguiente:
  1. Ovocitos compactos con más de tres capas de células del cúmulo
  2. Ovocitos con células extendidas
  3. Ovocitos desnudos

### 3.8. MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron sometidos a estadística descriptiva determinando la medida de tendencia central y dispersión, para las características morfométricas se utilizó un diseño completamente al azar para comparar las diferencias entre tratamientos, el número de folículos evaluados en relación a los tratamientos.

Siendo el modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Es la variable respuesta

$\mu$  = Promedio general del experimento

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $T_1=500$  UI,  $T_2=750$ ,  $T_3=1000$  UI de eCG y  $T_4=$  Testigo (sin eCG).

$E_{ij}$  = Efecto del error experimental.

La tasa de recuperación de ovocitos y la categorización del complejo-cúmulos ovocitos (COCs) fue sometido a una prueba de Chi cuadrado de homogeneidad para determinar la dependencia entre los tratamientos y las variables evaluadas, todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico R 4.0.3 (R Core Team, 2020).

Siendo la ecuación siguiente:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{(\theta_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$$

Dónde:

$\theta_i$  = Frecuencia observada.

$e_i$  = Frecuencia esperada.

$k$  = Numero de columnas.

$r$  = Numero de filas.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS FOLICULARES

La **Tabla 2.** muestra las características morfométricas foliculares en llamas evaluadas a través de la ultrasonografía en tres tratamientos multiovulatorios con eCG, determinando el diámetro folicular el día “0” (dos días posteriores a la ablación folicular), diámetro folicular el día de la aspiración folicular (OPU) y la tasa de crecimiento en mm/día. Las características morfométricas del diámetro folicular del día “0” y día de la aspiración folicular muestran diferencias siendo superiores los diámetros observados en el tratamiento con 1000 UI en comparación; mientras que las tasas de crecimiento (mm/día) no muestran diferencias estadísticas entre los tratamientos realizados; sin embargo, la tasa de crecimiento para el grupo sin estimulación muestra una menor tasa.

Los **diámetros foliculares** evaluados el día de aspiración folicular muestran diferencia debido a la dosis aplicada alcanzando tamaños foliculares de 6.13, 6.99 y 8.08 mm para 500, 750 y 1000 UI de eCG respectivamente y 7.61 mm para el tratamiento sin estimulación hormonal (tomando solo los folículos dominantes de cada una de las hembras), diámetros mayores a folículos en procesos de post desviación en llamas (entre 5.59 mm; Pérez *et al.*2020); el tiempo de crecimiento folicular fue de 6 días desde la observación de folículos reclutados hasta el momento de la aspiración folicular observando tasas de crecimiento de 1.03, 1.37 y 1.36 mm/día para 500, 750 y 1000 UI respectivamente y de 0.96 mm/día para el grupo sin estimulación. (Tabla 3.).

**Tabla 2.** Características morfométricas foliculares de llamas sometidas a tres dosis de eCG.

<b>Tratamiento</b>	<b>Diámetro folicular día "0"* (mm)</b>	<b>Diámetro folicular día de OPU ** (mm)</b>	<b>Tasa de crecimiento (mm/día)</b>
<b>eCG (500 UI)</b>	1.84 ± 1.07	6.13 ± 2.07	1.03 ± 0.49
<b>eCG (750 UI)</b>	1.58 ± 0.62	6.99 ± 1.44	1.37 ± 0.42
<b>eCG (1000 UI)</b>	1.87 ± 0.93	8.08 ± 2.29	1.36 ± 0.51
<b>Sin estimulación</b>	2.29 ± 0.44	7.61 ± 1.01	0.96 ± 0.34
	<b>p=0.041</b>	<b>p=0.0073</b>	<b>p=0.0918</b>

\* Día de la administración de eCG. \*\* Día de la aspiración folicular.

Las características de morfometría folicular permite determinar que las tasas de crecimiento obtenidas son superiores a lo reportado en estudios previos en ondas foliculares espontáneos siendo de 0.7, 0.92 y 0.66 mm/día (Cavilla et al., 2013; Chaves et al., 2002; Gallelli et al., 2020); sin embargo, son comparables a lo reportado en vacunos sincronizados con aplicación de eCG siendo de 1.1±0.1 mm/día respectivamente (Maraña et al., 2005). Las tasas de crecimiento mayores son debido al uso de la eCG hormona con acciones de LH y FSH principalmente que posee la capacidad de unirse a los receptores a nivel de la capa de la granulosa e induce la síntesis de Estradiol que generan el mayor desarrollo de folículos reclutados (Murphy & Martinuk, 1991; Rigoglio et al., 2013).

El **número de folículos promedio** evaluados al momento de la aspiración folicular en relación a los tres tratamientos de diferentes dosis multiovulatorios de eCG en llamas fueron determinados mediante ultrasonografía. La distribución de la población folicular con diámetros entre 3 y 6 mm fue para 500, 750 y 1000 UI de 4.4 ± 1.5, 2.2 ± 1.3 y 3 ± 1.1 número de folículos respectivamente, mientras que para folículos mayores a 7 mm se tiene para 500 UI fue 2.8 ± 1.9 folículos, para 750 UI fue 4.2 ± 1.8 folículos y

para 1000 UI fue de  $7.4 \pm 1.7$  folículos en promedio para cada grupo de animales; se observa una relación directa entre la mayor dosis de eCG y la mayor cantidad de folículos mayores a 7 mm observados. Sin embargo, en el grupo sin estimulación hormonal el día de aspiración un mayor número de folículos entre 3 a 6 mm siendo de 9.2 y solo 1 folículo mayor a 7 mm en promedio de los animales evaluados. Los datos se detallan en el siguiente cuadro.

**Tabla 3.** Número de folículos promedio en relación a los tratamientos.

Folículos	Tratamiento			
	eCG (500 UI)	eCG (750 UI)	eCG (1000 UI)	Sin estimulación
De 3 a 6 mm	$4.4 \pm 1.5$	$2.2 \pm 1.3$	$3 \pm 1.1$	$9.2 \pm 1.6$
Mayores a 7 mm	$2.8 \pm 1.9$	$4.2 \pm 1.8$	$7.4 \pm 1.7$	1

**p=0.02361**

En cuanto a la cantidad o número de folículos entre 3 y 6 mm en todos los tratamientos son parecidos siendo 4.4 folículos para 500 UI, 2.2 folículos para 750 UI y 3 folículos para 1000 UI con cantidades de folículos similares a lo reportado en dromedarios con 4.3 folículos menores a 6 mm con protocolos de eCG + FSH (Ararooti et al., 2017) debido a la vida media larga de la eCG que genera una estimulación continua de los folículos, por tanto se encontraran folículos con diferentes diámetros (Murphy & Martinuk, 1991); la diferencia se observa principalmente en los folículos mayores a 7 mm donde existe una relación directa tras la aplicación de dosis mayores de eCG; esta característica permite obtener folículos adecuados para la aspiración folicular y posterior obtención de ovocitos; tras la aplicación de 1000 UI de eCG se obtuvo  $7.4 \pm 1.7$  folículos resultados similares a estudios previos realizados en llamas y alpacas (Aller et al., 2010; Aller et al., 2019; Huanca, 2008) e inferiores a lo reportado por otros autores en llamas

(Carretero et al., 2010; W. Huanca et al., 2009) diferencia que se puede deber a los diferentes métodos de control de desarrollo folicular.

#### 4.2. ASPIRACIÓN FOLICULAR (OPU) – OBTENCIÓN DE OVOCITOS

La **tasa de recuperación** de ovocitos fue de 42.31%, 50% y 67.86% para los tratamientos de 500, 750 y 1000 UI de eCG respectivamente, observando que no hay diferencia en la proporción de ovocitos obtenidos mediante aspiración folicular (OPU) en los diferentes tratamientos; mientras que para el tratamiento sin estimulación hormonal se observó una tasa de 50%. La comparación de estas tasas de recuperación no muestra diferencia estadística por tanto no existe relación alguna entre la dosis de eCG (500, 750 y 1000 UI) y la cantidad de ovocitos obtenidas mediante aspiración folicular (OPU) en llamas ( $p=0.1223$ ); tal como se observa en la Tabla 3.

**Tabla 4.** Tasa de recuperación de ovocitos según tratamiento de folículos de llamas superestimuladas con eCG.

Tratamiento	Nº de folículos aspirados	Nº de COCs* colectados	Tasa de recuperación de COCs (%)
eCG (500 UI)	26	11	42.31
eCG (750 UI)	36	18	50.00
eCG (1000 UI)	56	38	67.86
sin eCG (0 UI)	6	3	50.00

• Complejo-cúmulos ovocito (COCs) **p=0.1223**

Las **tasas de recuperación** son inferiores a lo reportado en otros estudios en llamas (Berland et al., 2011; Brogliatti et al., 2000; Ratto et al., 2005; Trazorras et al., 2009). Sin embargo, al ser un estudio preliminar se puede indicar que es una tasa de recuperación de complejo cumulo ovocito (COCs aceptable puesto que la aspiración se realizó con un transductor transvaginal de uso en medicina humana modificada para camélidos; abriendo un campo interesante para la aplicación de esta biotecnología en la producción de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos.

La Tabla 4. Muestra la **categorización de complejo-cumulo ovocito (COCs)** obtenidos según tratamiento de folículos de llamas superestimadas con eCG. Para los COCs expandidos: 50% 61.11% y 55.26%; COCs compactos 30%, 27.78% y 28.95%; COCs desnudos 20%, 11.11% y 15.79% para los tratamientos de 500, 750 y 1000 UI de eCG respectivamente, observándose de que no existe diferencia estadísticamente entre la proporción de categorías de COCS en los diferentes tratamientos; mientras que para el grupo testigo (sin estimulación hormonal) se observó COCs expandidos: 0% COCs compactos 66.67%; COCs desnudos 33.33% , tal como se observa en la Tabla 4.

**Tabla 5.** Categorización de COCs obtenidos según tratamiento de folículos de llamas superestimadas con eCG.

<b>Tratamiento</b>	<b>COCs colectados</b>	<b>N° de COCs expandidos (%)</b>	<b>N° de COCs compactos (%)</b>	<b>N° de COCs desnudos (%)</b>
<b>eCG (500 UI)</b>	11 (100%)	50.00	30.00	20.00
<b>eCG (750 UI)</b>	18 (100%)	61.11	27.78	11.11
<b>eCG (1000 UI)</b>	38 (100%)	55.26	28.95	15.79
<b>sin eCG (0 UI)</b>	3 (100%)	0	66.67	33.33

**p=0.6576**

La **categorización de complejo-cumulo ovocito (COCs)** en lo que respecta COCs expandidos, compactos y desnudados son inferiores a lo reportado en otros estudios en llamas (Trasorras et al., 2009; Brogliatti et al., 2000; Ratto et al., 2005).



## V. CONCLUSIONES

Con un incremento de las dosis de eCG se logra mayor número de folículos y de mayor tamaño.

Que la proporción de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía son similares.



## VI. RECOMENDACIONES

Que la recuperación de los ovocitos de los folículos de ovarios superovulados en llamas con diferentes dosis de eCG se puede realizar.

Que se estudie exactamente la presión necesaria de aspiración folicular para una recuperación de ovocitos en mayor proporción

Que se evalué a los ovocitos recuperados con técnicas que proporcionen la viabilidad para una posterior fertilización in vitro.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aba, M., Forsberg, M., Kindahl, H., & Sumar, J. (1995). Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet Scand.* 36, 489-498.
- Adams, G., Sumar, J., & Ginther, O. (1990). Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J Reprod Fert.* 90, 535-545.
- Adam, C. L., Bourke, D. A., Kyle, C. E., Young, P., & McEvoy, T. G. (1992). Ovulation and embryo recovery in the llama. In: Allen WR, Higgins AJ, Mayhew IG, Snow D, Wade JF (eds), *Proceedings of the 1st International Camel Conference*. R & W Publications, Newmarket, UK, pp., 125–127.
- Adams, G., & Ratto, M. (2001). Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Rev Inv Vet Perú. Suppl.*, 134-141.
- Adams, G. P., Ratto, M. H., Huanca, W., & Singh, J. (2005). 'Ovulation-Inducing Factor in the Seminal Plasma of Alpacas and Llamas', *Biology of Reproduction*, 73/3: 452–7. DOI: 10.1095/biolreprod.105.040097
- Alberio R H y Aller J F (1996): Control y sincronización de la onda folicular mediante la aplicación de progesterona exógena en llamas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 16(4), 325-329.
- Agüero A, Miragaya M H, Ferrer M S, Capdevielle, E F, Chaves M G y Rutter B (2001): Follicular dynamics in (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*. 34, 1119-1127.
- Australian Alpaca Association. (2008). *ALPACA FACT BODY CONDITION SCORE (BCS) OF ALPACAS FACT FURTHER READING*. 4.



- Aller, J F, Cancino, A. K., Rebuffi, G. E., & Alberio, R. H. (2010). Effect of estradiol benzoate used at the start of a progestagen treatment on superovulatory response and embryo yield in lactating and non-lactating llamas. *Animal Reproduction Science*, 119(3–4), 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.001>
- Aller, Juan F, Abalos, M. C., Acuña, F., & Cancino, A. K. (2019). Plasma steroid profiles and ovarian response in llamas treated with eCG for superovulation combined with exogenous progesterone during early luteal phase. *Animal Reproduction Science*, 208(March), 106108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106108>
- Ararooti, T; Niasari.Naslali, A; Razavi, K; Panahi, F. (2017). Comparing three superovulation protocols in dromedary camels : FSH , eCG-FSH and hMG. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(4), 249–252.
- Bravo, W. (1990). Studies on ovarian dynamics and response to copulation in the south american camelids. *Lama glama and Vicugna pacos. Tesis Doctor Philosophy*, 88.
- Bravo, W. (1990). Studies on ovarian dynamics and response to copulation in the south american camelids. *Lama glama and Vicugna pacos. Tesis Doctor Philosophy*, 88.
- Balakier, H. (2002). ‘Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos’, *Human Reproduction*, 17/9: 2394–401. DOI: 10.1093/humrep/17.9.2394
- Brogliatti, G; Palasz, A; Rodriguez-Martinez, H; Mapletoft, R; Adams, G. (2000). Transvaginal collection and ultrastructure of llama (*Lama glama*) oocytes. *Theriogenology*, 54, 1269–1279.



- Berland, M. A., Baer, A. Von, Ruiz, J., Parraguez, V. H., Morales, P., & Adams, G. P. (2011). In vitro fertilization and development of cumulus oocytes complexes collected by ultrasound-guided follicle aspiration in superstimulated llamas. *Theriogenology*, 75(8), 1482–1488. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.047>
- Bourke D, Adam C, Kyle C, Young P y Mc Evo T G (1992b): Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. Procc. 12th Congress on Animal Reproduction, Vol. 1 The Hague, 23-27 August. pp:193-195
- Bourke D A, Adam C L, Kile C, Young P y Me Evoy T G (1995b): Recipient synchronization, and embryo transfer in South American camelids. *Theriogenology*. 43, 171.
- Carretero, M. I., Miragaya, M., Chaves, M. G., Gambarotta, M., & Agüero, A. (2010). Embryo production in superstimulated llamas pre-treated to inhibit follicular growth. *Small Ruminant Research*, 88(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.006>
- Cavilla, M. V, Bianchi, C. P., Maistruarena, C., & Aba, M. A. (2013). *Ultrasonographic and Endocrine Characterization of Follicular Waves in Llamas with a Special Reference to the Overlapping Phenomenon During Successive Waves*. 930, 923–930.
- Chaves, M. ., Aba, M., Agüero, A., Egey, J., Berestin, V., & Rutter, B. (2002). Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Animal Reproduction Science*, 69(1–2), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00173-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00173-7)



- Condorena N y Velasco J (1977): Comparación de dos sistemas de empadre en la alpaca. Resúmenes de Proyectos de Investigación UNMSM, Tomo II, Lima-Perú. pp: 98.
- Ebner, T., Shebl, O., Moser, M., Sommergruber, M., & Tews, G. (2008). 'Developmental fate of ovoid oocytes', *Human Reproduction*, 23/1: 62–6. DOI: 10.1093/humrep/dem280
- Fernández Baca S, Hansel W y Novoa C (1970b): Embryonic mortality in the alpaca. *Biol. Reprod.* 3(2), 243-251.
- Fernández-Baca S, Novoa C y Sumar J (1974): Pubertad en alpacas. Avances de Investigación. Bol. de Div. N° 15 IVITA UNM San Marcos. Lima-Perú. pp: 129-138.
- Fowler M E (1989): *Medicine and surgery of South American Camelids*. Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco. Iowa State University Press, Ames.
- S.D. Fields, B.L. Perry, G.A. Perry. (2009). Effects of GnRH treatment on initiation of pulses of LH, LH release, and subsequent concentrations of progesterone. *Domestic Animal Endocrinology*. 37: 189–195
- Gigli, I., Russo, & Agüero, A. (2006). *Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos*. Buenos Aires: Chorroarin 280.
- Gallelli, M. F., Bianchi, C., Zampini, E., Aba, M., Gambarotta, M., & Miragaya, M. (2020). Plasma IGF1 and 17 $\beta$ -Estradiol Concentrations During the Follicular Wave in Llamas. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(October), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.555261>



- Hanco, EG; LLacsa, J; Quispe, YM; Pérez MG, Luque, N; Perez, U. (2015). Dinámica folicular ovárica en alpacas de la raza suri (*Vicugna pacos*). *Spermova*, 5(1), 51–54. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.11>
- Hafez ESE y Hafez B (2002): Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma. Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México. 519, 33-69.
- Huanca, T. (2008). *Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y en la producción de embriones en alpacas (Vicugna pacos)*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., Cardenas, O., Adams, G. P., & Ratto, M. H. (2009). Ovarian response and embryo production in llamas treated with equine chorionic gonadotropin alone or with a progestin-releasing vaginal sponge at the time of follicular wave emergence. *Theriogenology*, 72(6), 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.019>
- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinis, S., & Michalas, S. (1999). 'Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection', *Fertility and Sterility*, 72/2: 240–4. DOI: 10.1016/S0015-0282(99)00233-2
- Maraña, D; Cutaia, L; Peres, L; Pincinato, D; Borges, LF; Bó, G. (2005). Ovulation and pregnancy rates in postpartum bos indicus cows treated with progesterone vaginal devices and Estradiol benzoate, with or without eCG and temporary weaning. *Reproduction Fertility And Development*, 18(2). <https://doi.org/10.1071/RDv18n2Ab16>



- Miragaya, M. H., Aba, M. A., Capdevielle, E. F., Ferrer, M. S., Chaves, M. G., Rutter, B., & Agüero, A. (2004). Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuna (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*, *61*(4), 663–671. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00238-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00238-3)
- Miragaya, M.H., Chaves, M.G., Agüero, A. 2005. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research* 61: 299-310.
- Miragaya, M. H., Chaves, M. G., & Agüero, A. (2006). ‘Reproductive biotechnology in South American camelids’, *Small Ruminant Research*, 61/2-3 SPEC. ISS.: 299–310. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.017
- Murphy, B. D., & Martinuk, S. D. (1991). Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*, *12*(1), 27–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-27>
- Nicosia, S. V., Wolf, D. P., & Inoue, M. (1977). ‘Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs’, *Developmental Biology*, *57*/1: 56–74. DOI: 10.1016/0012-1606(77)90354-2
- Navarro, P. A., de Araújo, M. M., de Araújo, C. M., Rocha, M., dos Reis, R., & Martins, W. (2009). ‘Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality’, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, *104*/3: 226–9. 107 *International Federation of Gynecology and Obstetrics*. DOI: 10.1016/j.ijgo.2008.11.008
- Novoa C, Fernández-Baca S, Sumar J y Leyva V (1972): Pubertad en la alpaca. Revista de investigaciones pecuarias (IVITA). UNMSM, Lima-Perú. 1, 29 – 35.



- Núñez-Olivera, R., De Castro, T., García-Pintos, C., Bó, G., Piaggio, J., & Menchaca, A. (2014). Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Animal Reproduction Science*, 146(3–4), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.017>
- 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.
- Plant, T. M., & Zeleznik, A. J. (2015). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.*, Vol. 1. Elsevier
- Pérez, M. G. (2019). 'Producción de embriones in vitro en una incubadora portatil de dióxido de carbono y viabilidad in vivo post transferencia a vacas receptoras', *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 21/4: 249–56. DOI: 10.18271/ria.2019.501
- Pieterse, M.C., Kappen, K.A., kruip, th. A.M. and Taverne, M.A.M.. (1998). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. pages 751 – 762.
- Ratto, M., Gómez, C., Berland, M., & Adams, G. P. (2007). Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 97, 246–256.
- Ratto M H, Singh J, Huanca W y Adams G P (2003): Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology*. 60, 1645-1656.



- Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. P. (2005). *In vitro and in vivo maturation of llama oocytes*. *63*, 2445–2457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.053>
- Rigoglio, N. N., Fátima, L. A., Hanassaka, J. Y., Pinto, G. L., Machado, A. S. D., Gimenes, L. U., Baruselli, P. S., Rennó, F. P., Moura, C. E. B., Watanabe, I., & Papa, P. C. (2013). Theriogenology Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. *Theriogenology*, *79*(4), 673–679. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.023>
- Riveros, J. L., Schuler, G., Bonacic, C., Hoffmann, B., Chaves, M. G., & Urquieta, B. (2010). Ovarian follicular dynamics and hormonal secretory profiles in guanacos (*Lama guanicoe*). *Animal Reproduction Science*, *119*, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.11.005>
- Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., et al. (2008). ‘Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome’, *Fertility and Sterility*, *90*/5: 1692–700. Elsevier Ltd. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2007.09.024](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.024)
- 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.
- Santi Quispe, L. (2018). *Aspiración folicular guiada mediante ultrasonografía con el transductor endovaginal humano para la colección de ovocitos en vacas Brown Swiss en altura*. Universidad Nacional del Altiplano.



- Sansinena M J, Taylor S A, Taylor P J, Denniston R S y Godke R A (2003): Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from in vitro matured llama oocytes. *Cloning Stem Cells*. 5, 191–198.
- Sansinena M J, Taylor S A, Taylor P J, Schmidt E E, Denniston R S y Godke R A (2007): In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: Effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 99, 342–353.
- Schams D, Menzer C, Schallenberger E, Hoffman B, Hahn J y Hahn R (1978): Some studies of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. En: *Control of reproduction in the cow*. Ed: J.M. Sreenan. Martin Nijhoff, The Hague. pp: 122-142.
- SENAMHI. 2016. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología
- Sumar, J. (1985). *Reproductive physiology in South American Camelids. Genetics of Reproduction in Sheep*. The several contributors named in the list of contents.  
DOI: 10.1016/b978-0-407-00302-6.50012-x
- Sumar, J. B. (1996). ‘Reproduction in llamas and alpacas’, *Animal Reproduction Science*, 42/1–4: 405–15. DOI: 10.1016/0378-4320(96)01538-2
- Sumar, J. B. (1996). ‘Reproduction in llamas and alpacas’, *Animal Reproduction Science*, 42/1–4: 405–15. DOI: 10.1016/0378-4320(96)01538-2
- Trasorras, V., Chaves, M. G., Miragaya, M. H., Pinto, M., Rutter, B., Flores, M., & Agüero, A. (2009). Effect of eCG superstimulation and Buserelin in cumulus–



- oocytes complexes recovery and maturation in llamas (*Lama glama*). *Reprod. Domest. Anim.* 44, 359–364.
- Tibary, A. (2017). Theriogenology Monitoring and controlling follicular activity in camelids. *Theriogenology*, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.011>
- Uri Perez, G., David Pari, P., Fidel Gutierrez, Y., Julio Málaga, A., Natalio Luque, M., Rolando Rojas, E., & Manuel Pérez, D. (2021). Transvaginal and transrectal ultrasonographic comparison of follicular dynamics in successive waves of llamas (*Lama glama*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I1.19504>
- Vaughan, J. (2011). Ovarian function in South American camelids ( alpacas , llamas , vicunas, guanacos) &. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 237–243.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.031>
- Vaughan, J. L. (2001). *Control of ovarian follicular growth in the alpaca (Lama pacos)* (C. Q. U. Animal Sciences and Production Group (ed.)).
- Vaughan, J. L., Macmillan, K. L., & Occhio, M. J. D. (2004). *Ovarian follicular wave characteristics in alpacas.* 80, 353–361.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.08.002>
- Vaughan, J. L., & Tibary, A. (2006). Reproduction in female South American camelids : A review and clinical observations &. *Small Ruminant Research*, 61, 259–281.  
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.015>



Wilding, M., Di Matteo, L., D'Andretti, S., Montanaro, N., Capobianco, C., & Dale, B.

(2007). 'An oocyte score for use in assisted reproduction', *Journal of Assisted*

*Reproduction and Genetics*, 24/8: 350–8. DOI: 10.1007/s10815-007-9143-8

## ANEXOS



**Figura 03.** Administración de la hormona coriónica equina (eCG).



**Figura 04.** Administración de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH).



**Figura 05.** Fijación del animal con correas sobre la mesa de exploración.



**Figura 06.** Aplicación de la anestesia epidural baja (lidocaína 2%) a una cantidad de 2.5 ml.



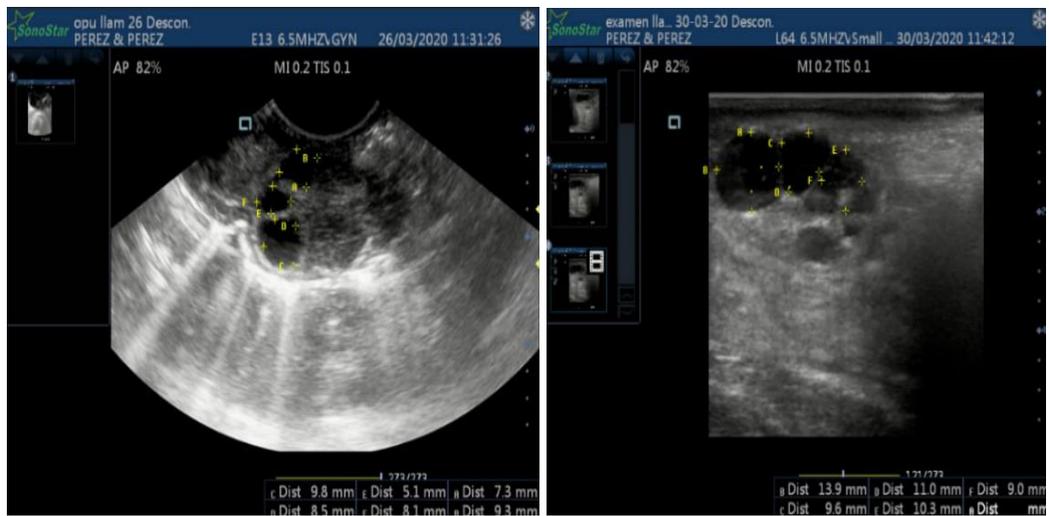
**Figura 07.** Materiales y equipo para la aspiración folicular.



**Figura 08.** Transductor micro convexo con su guía de aguja para la aspiración 1084 folicular.



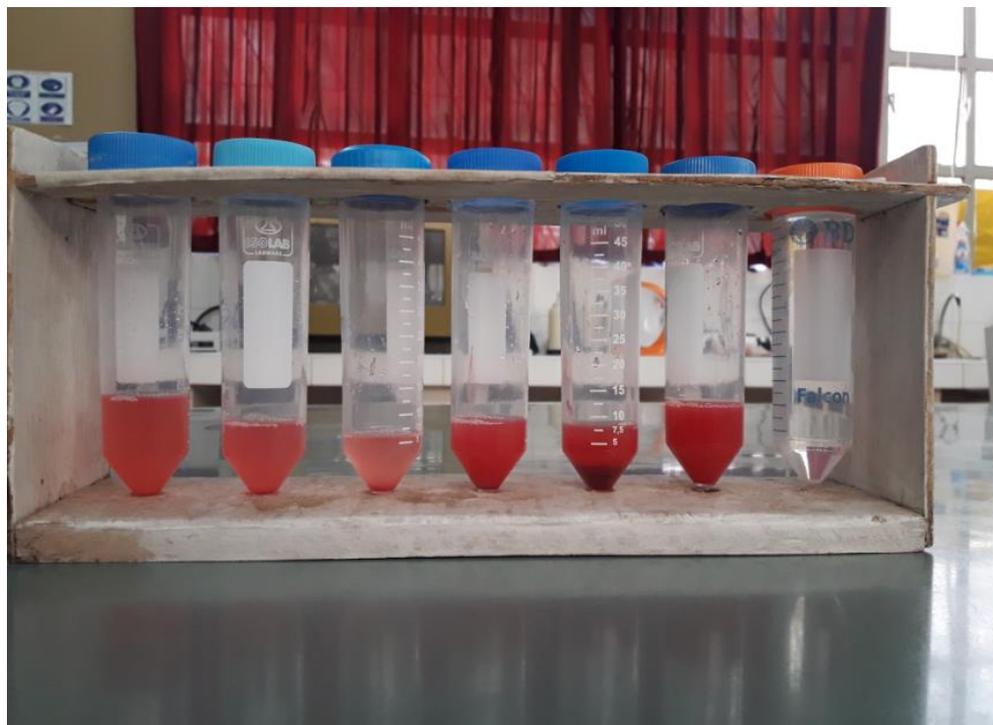
**Figura 09.** Ubicación del transductor micro convexo en el fórnix de la vagina.



**Figura 010.** Imagen del ovario con folículos múltiples por efecto de la hormona (eCG)



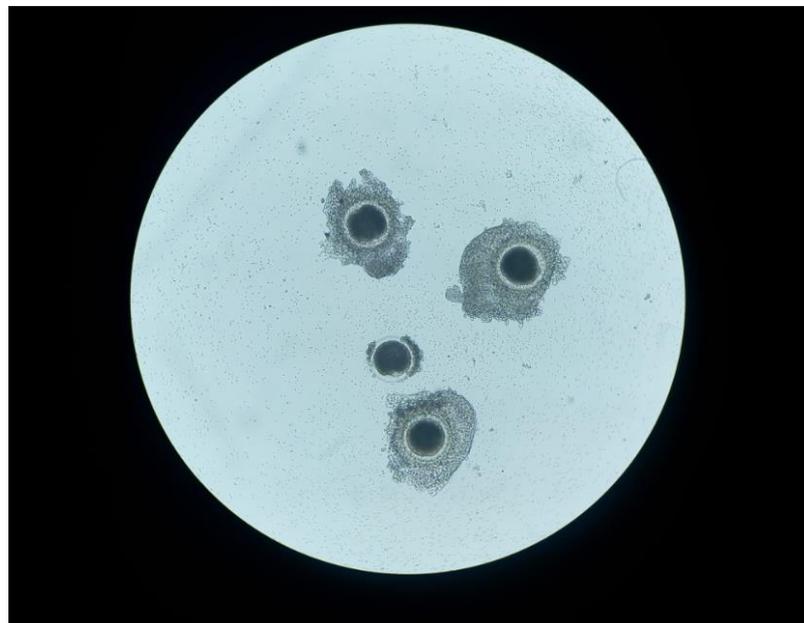
**Figura 011.** Imagen de un folículo dominante sin estimulación hormonal.



**Figura 012.** Tubos Falcon con fluido folicular aspirado.



**Figura 013.** Búsqueda y selección de complejo cúmulo ovocitos (COCs).



**Figura 014.** Complejo cúmulo ovocitos (COCs) seleccionados.