

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“HORMONA ANTIMÜLLERIANA Y SU RELACIÓN CON  
FOLÍCULOS, OVOCITOS Y ONDA FOLICULAR EN ALPACAS  
SURI”**

**Presentada por:**

**NATHALIE ZIRENA ARANA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Lima – Perú**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“HORMONA ANTIMÜLLERIANA Y SU RELACIÓN CON  
FOLÍCULOS, OVOCITOS Y ONDA FOLICULAR EN ALPACAS  
SURI”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**NATHALIE ZIRENA ARANA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Ph.D. Javier Ñaupari Vásquez  
**PRESIDENTE**

Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca  
**PATROCINADOR**

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso  
**MIEMBRO**

Mg.Sc. Wilder Trejo Cadillo  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional. No hay mejores en este mundo que ustedes.

A mis hermanas por llenarme de alegrías y consejos. Verlas crecer profesionalmente es mi mejor motivación.

A mis maestros y amigos, por darme esta oportunidad y creer en mí.

A todos los ganaderos alpaqueros. Su esfuerzo y dedicación a la crianza de estos animales es impresionante.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por darme la vida y la salud, cuidándome en cada viaje realizado.

Al proyecto CONCYTEC-036-2015 por el financiamiento.

Al PhD. Javier Ñaupari por la oportunidad de poder ingresar a la beca de Maestría. Es loable el trabajo y paciencia que ha tenido con todos los becarios.

A mis asesores, la PhD. (c) Amalia Gallegos y el Mg. Sc. Enrique Alvarado. Gracias por su amistad, consejos y paciencia en todo este tiempo. Gracias por los conocimientos compartidos dentro y fuera de aulas. Gracias por las oportunidades brindadas.

A todo el personal del C.I.P. Chuquibambilla, en especial a los exdirectores MVZ. Juan Zevallos (Q.E.P.D.) y al MVZ. Rolando Rojas, al Mg.Sc. Hugo Deza y a su equipo de trabajo (Rassiel, Gloria, Juan, César, Richer, Wagner), a la Sra. María, al pastor Mauro y a los estudiantes de la Escuela de Prácticos Agropecuarios. Gracias por la invaluable ayuda, consejos y las amistades formadas.

Al Mg. Sc. Wilfredo Huanca y al MV. Alfredo Pozo. Gracias por el apoyo, consejos y buen ambiente formado con su grupo de trabajo: Álvaro, Melissa, Gabriel, Cecibel, las “chiquibrujas” (Liz, Melany, Gabriela), Abiel, Paulo, Giovanni y Nancy. A Renato por todo el cariño y esfuerzo que hizo por estar allí.

Al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la UPCH, en especial a la PhD. Manuela Verástegui, a la Mg. Sc. Danitza Dávila y al Mg Sc. Homero Céliz, por su colaboración con el análisis de las muestras.

Al personal y amigos del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva: Sr. Miguel, Rene y Julio. Gracias por su apoyo.

A las grandes amistades que se han forjado en estos años de duración de la maestría: Fritz, Jimny, Cynthia, Ale y todos los becarios de mi promoción. Gracias por sus consejos, risas, confidencias y amistad. Les deseo lo mejor.

# ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1	Importancia de la producción de camélidos domésticos en el Perú	3
2.2	Avances en biotecnologías reproductivas en alpacas en el Perú	5
2.2.1	Inseminación artificial	5
2.2.2	Ovulación múltiple y transferencia de embriones	6
2.2.3	Fertilización <i>in vitro</i>	6
2.3	Fisiología reproductiva de la alpaca hembra	7
2.3.1	Anatomía	7
2.3.2	Pubertad	8
2.3.3	Estacionalidad	8
2.3.4	Tipo de ovulación y cópula	9
2.3.5	Crecimiento folicular	10
2.3.6	Endocrinología de la ovulación	11
2.3.7	Métodos artificiales de inducción de la ovulación	14
2.4	Evaluación de la reserva ovárica	14
2.4.1	Conteo de folículos antrales	15
2.4.2	Marcadores hormonales	16
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1	Lugar de estudio	20
3.2	Materiales	21
3.3	Animales	21
3.4	Metodología experimental	23
3.4.1	Estudio I: Cuantificación de hormona antimülleriana por edades y entre grupos de alta y baja concentración	23

3.4.2 Estudio II: Comparación de cantidad y tamaños de folículos entre grupos de alta y baja concentración de hormona antimülleriana	24
3.4.3 Estudio III: Relación entre calidad de ovocitos con grupos de alta y baja concentración de hormona antimülleriana	25
3.4.4 Estudio IV: Cuantificación de la hormona antimülleriana en la onda folicular	26
3.5 Procedimiento quirúrgico	26
3.5.1 Preoperatorio	26
3.5.2 Trans operatorio	26
3.5.3 Postoperatorio	27
3.6 Protocolo anestésico	28
3.6.1 Preanestesia	28
3.6.2 Inducción	28
3.6.3 Mantenimiento	28
3.6.4 Despertar	28
3.7 Registro de información	28
3.8 Análisis estadístico	28
3.8.1 Descriptivo	29
3.8.2 Modelo estadístico	29
3.8.3 Comparaciones	30
3.8.4 Correlación	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Estudio I: Cuantificación de hormona antimülleriana por edades y entre grupos de alta y baja concentración	31
4.2 Estudio II: Comparación de cantidad y tamaños de folículos entre grupos de alta y baja concentración de hormona antimülleriana	34
4.3 Estudio III: Relación entre calidad de ovocitos con grupos de alta y baja concentración de hormona antimülleriana	35
4.4 Estudio IV: Cuantificación de la hormona antimülleriana en la onda folicular	37

V.	CONCLUSIONES	40
VI.	RECOMENDACIONES	41
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
VIII.	ANEXOS	56

## ÍNDICES DE TABLAS

Tabla 1: Categorización de los ovocitos	25
Tabla 2: Número de ovocitos en grupos de alta y baja concentración de AMH en relación con la calidad	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Secreción de AMH en el crecimiento folicular (Broekmans et al. 2008)	19
Figura 2: Vía de señalización de la AMH (Visser et al. 2005)	19
Figura 3: Ubicación espacial del C.I.P. Chuquibambilla	20
Figura 4: Sistema de evaluación de condición corporal para llamas y alpacas (modificado de Cebra et al. 2014)	22
Figura 5: Esquema experimental para las alpacas seleccionadas para cirugía	25
Figura 6: Esquema del seguimiento de la onda folicular	26
Figura 7: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de AMH según edades en alpacas	31
Figura 8: Comparación entre grupos de alta y baja concentración de AMH en relación con el porcentaje de tamaño de folículos	34
Figura 9: Perfil hormonal de AMH durante la onda folicular de cinco alpacas	37
Figura 10: Correlación entre la concentración de AMH con el tamaño del folículo dominante en la onda folicular	38

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Materiales, reactivos, fármacos y equipos	57
ANEXO 2: Registro de concentración promedio de AMH	58
ANEXO 3: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de AMH en alpacas	59
ANEXO 4: Concentración de AMH según edades en las alpacas	60
ANEXO 5: Diagrama de cajas y bigotes para la comparación entre los grupos de alta y baja concentración de AMH	61
ANEXO 6: Comparación entre grupos de alta y baja concentración de AMH en relación con el porcentaje de folículos en los grupos por tamaños	62
ANEXO 7: Asociación de concentración de AMH y tamaño del folículo durante la onda folicular	63

## ABREVIATURAS

µg: microgramo

AA: aminoácidos

ALK: kinasa similar al receptor de activina

BMP: proteína morfogénica ósea

CIP: Centro de Investigación y Producción

cm: centímetro

DLS: diferencia límite de significación

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

*et al.*: y otros

G: gauss

GDF: factor de diferenciación de crecimiento

ha: hectárea

INIA: Instituto Nacional de Innovación Agraria

KDa: kiloDalton

kg: kilogramo

L: litro

MHz: megahercio

ml: mililitro

mm: milímetro

msnm: metros sobre el nivel del mar

ng: nanogramo

pmol: picomol

RPM: revoluciones por minuto

TGF: factor de crecimiento transformante

UI: Unidades Internacionales

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue relacionar altos y bajos niveles de la hormona antimülleriana (AMH) plasmática con la cantidad y tamaño de folículos y calidad de ovocitos, y describir su comportamiento a lo largo de la onda folicular en alpacas suri. El estudio fue realizado entre los meses de enero y marzo del 2016 y noviembre a marzo del 2017 en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano (Umachiri, Puno). Se trabajó con 54 alpacas hembra vacías en edad reproductiva, separándolas por cuartiles según los niveles hormonales y se comparó los grupos extremos. El grupo de alta concentración de AMH presentó mayor cantidad de folículos a diferencia del grupo de baja concentración ( $20.51 \pm 2.76$  vs.  $11.58 \pm 2.55$ , respectivamente). No hubo diferencias estadísticas significativas entre los grupos de AMH y el tamaño de los folículos. Además, en el grupo de alta concentración se encontró dependencia entre la cantidad y calidad de los ovocitos ( $p = 0.02$ ). En la onda folicular, la AMH presentó asociación positiva con el crecimiento del folículo dominante ( $r^2 = 0.52$ ). Los resultados nos revelan que la AMH plasmática puede utilizarse como biomarcador para seleccionar a las mejores donantes para los protocolos de superovulación en alpacas suri.

Palabras claves: Hormona antimülleriana, folículos, ovocitos, onda folicular, alpaca

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the relationship between high and low levels of plasma anti-Müllerian hormone (AMH) on number and size of follicles, oocyte quality, and its behavior on the follicular wave in Suri alpacas. The study was carried out at the Research and Production Center Chuquibambilla of Altiplano's National University (Umachiri, Puno) between January and March 2016; and November to March, 2017. 54 female alpacas in reproductive age were used, separating them by quartiles according to the hormonal levels and comparing the extreme groups. The high concentration group of AMH had a greater number of follicles than the low concentration group ( $20.51 \pm 2.76$  vs.  $11.58 \pm 2.55$ , respectively). No significant statistical differences between the AMH groups and the size of the follicles were found. In addition, there was dependence in the high AMH concentration group with quantity and quality of the oocytes ( $p = 0.02$ ). In the follicular wave, the AMH is positive associated with the growth of the dominant follicle ( $r^2 = 0.52$ ). Results reveal that plasma AMH can be used as a biomarker to select the best donors for superovulation protocols in Suri alpacas.

Key words: anti-Müllerian hormone, follicles, oocytes, follicular wave, alpaca

## I. INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos domésticos es considerada una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socioeconómico de la población altoandina del Perú, no sólo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales; sino por su capacidad de utilizar pasturas naturales de baja calidad, condiciones que no pueden ser igualadas por otras especies domésticas (Huanca 2004).

Los estudios en biotecnologías reproductivas en estas especies siguen siendo escasos en comparación con otros animales de producción y representa el esfuerzo de pequeños grupos de investigadores a nivel mundial (Ratto *et al.* 2013). La transferencia de embriones en camélidos sudamericanos ofrece el potencial para tomar ventaja de la capacidad reproductiva de la donadora con alto mérito genético en los rebaños domésticos (Sumar 2013). El poco éxito de la técnica de transferencia de embriones en alpacas ha estado relacionado a la gran variabilidad de la respuesta superovulatoria y baja tasa de recuperación embrionaria (Ratto *et al.* 2013).

La hormona antimülleriana (AMH) ha mostrado ser un indicador clínico confiable en la evaluación de la reserva ovárica (Reyes 2010) y puede ayudar a predecir la respuesta animal a los tratamientos de superovulación. La AMH fue un buen predictor para el número de folículos y ovocitos en vacunos (Gamarra *et al.* 2015; Rico *et al.* 2012) y en ovinos (Torres- Rovira *et al.* 2014; Lahoz *et al.* 2014). Además, la AMH mantiene sus niveles estables a lo largo del ciclo menstrual en mujeres fértiles (Hehenkamp *et al.* 2006), en mujeres infértiles (van Disseldorp *et al.* 2009) y en vacas multíparas, lo que nos da una clara ventaja como biomarcador del estado de la reserva ovárica en comparación con hormonas como FSH, LH y estradiol (Hehenkamp *et al.* 2006), pues la muestra de sangre se podría tomar en cualquier momento del ciclo estral o menstrual.

Hasta la fecha, no existen artículos científicos publicados sobre la medición de la AMH en alpacas, siendo éstos necesarios para poder elegir a las mejores donantes para la transferencia embrionaria, reduciendo la variabilidad en la respuesta y gastos innecesarios en los protocolos de superovulación.

Por lo tanto, el objetivo general de este estudio fue relacionar la AMH con folículos y ovocitos, y su comportamiento en la onda folicular en alpacas suri. Los objetivos específicos fueron cuantificar la AMH por edades y entre grupos de alta y baja concentración, comparar cantidad y tamaños de folículos entre grupos de alta y baja concentración de AMH, relacionar calidad de ovocitos con los grupos de alta y baja concentración de AMH y cuantificar la concentración de AMH plasmática a lo largo de la onda folicular.

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 Importancia de la producción de camélidos domésticos en el Perú

Existen cuatro especies de camélidos sudamericanos, siendo la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*) las especies domésticas. A nivel mundial, el Perú cuenta con la mayor población de alpacas, siendo ésta de 3 685 500 de animales, concentrándose en la Sierra, aproximadamente, el 100% del total (INEI 2012). Las llamas, siendo los animales más dóciles entre los camélidos sudamericanos, también tienen una importante presencia en nuestro país, teniendo un aproximado de 1 268 920 animales (Ministerio de Agricultura 2007).

Existen varias características únicas y favorables en los camélidos, en adaptación y con la conservación del ambiente: a) Eficiencia para convertir en fibra y carne pasturas de baja calidad, resultante de la baja fertilidad de los suelos y deficiente manejo de las praderas, donde la disponibilidad del recurso hídrico está supeditado a la época de lluvias; b) Patas largas y delgadas que les permiten desplazarse con facilidad en una topografía irregular y agreste. Este atributo en la llama, en especial, jugó un rol importante como animal de carga y transporte de insumos y productos en la producción agrícola en la topografía andina accidentada, así como en el acceso y control de pisos ecológicos; c) Pezuñas con dos dedos, uñas y plantas acolchadas con piel gruesa, característica importante para proteger el pasto del pisoteo, evitando la exposición del suelo a la erosión; d) Hábito de excretar en lugares predeterminados, evitando así la contaminación del ambiente; e) Consumo del pasto sin dañar el débil pastizal de las praderas de la puna (ONUDI 2010, Ruíz 2013, Canahua Murillo y Canahua 2015).

La crianza tradicional o de pequeños productores de alpacas concentra el 80% de la población, aplicando los conocimientos transmitidos por la herencia de sus antecesores y se realiza en zonas altoandinas entre los 3850 a 5500 msnm. Estos pequeños productores son aproximadamente 150,000 familias de las comunidades campesinas aimaras y

quechuas y se crían en áreas menores de 50 ha. De manera que, la tenencia promedio sería de 27 cabezas/alpaca/familia y de 9 cabezas/llama/familia. El resto están en manos de medianos propietarios y algunas empresas (Canahua Murillo y Canahua 2015).

Los pobladores altoandinos del país se dedican exclusivamente a la crianza de alpacas y llamas, constituyéndose en su principal actividad económica, pero al estar dentro de una economía de subsistencia, deben diversificar sus actividades, elaborando prendas artesanales para el autoconsumo (con fibra de alpaca y ovino), comercio en los mercados semanales o *k'atos* de carne, fibra y pieles, en donde también se abastecen de productos de primera necesidad, empleos eventuales en minas o para el municipio, migración temporal y la crianza mixta (vacunos, ovinos, alpacas y llamas) (Torres 2007).

Los productos que los criadores obtienen de la alpaca pueden ser fibra, carne, piel y cuero, y estiércol. La fibra, producto emblemático de la producción alpaquera del país, es fina y suave al tacto. Muy cotizada por la industria textil, tiene propiedades térmicas e higroscópicas, además de su capacidad de elasticidad y resistencia. Cuenta con una variedad de los colores definidos, que van del blanco pasando por todos los tonos del café y todos los tonos del gris hasta el negro (ONUDI 2010). La carne es utilizada principalmente para el autoconsumo y para la venta en los mercados regionales, aunque su alto contenido nutricional y su bajo contenido de colesterol, pueden otorgarle un valor agregado para mejorar los ingresos de los productores. La piel y el cuero se utiliza básicamente para la artesanía (Ruíz 2013). La producción de estiércol es un recurso adicional producto del pastoralismo, que en las condiciones altoandinas sirve como combustible para cocinar y para la calefacción. Naturalmente vuelve a la tierra, contribuyendo a mantener los niveles de fertilidad y la productividad primaria de los pastizales (IUCN 2008).

Existen factores negativos para la competitividad de la producción alpaquera. El mayor problema es el reducido volumen de producción, sumado con un gran tiempo en el intervalo generacional, malas condiciones de salud, escasa infraestructura y tecnología y los problemas con la aplicación de biotecnologías reproductivas, ocasionando una producción insuficiente, lenta, de baja calidad y, sobre todo, mal remunerada para el pequeño productor.

## **2.2 Avances en biotecnologías reproductivas en alpacas en el Perú**

Las biotecnologías reproductivas son herramientas que nos ayudan al progreso genético de las especies domésticas y aportan nuevas soluciones para facilitar el manejo genético de poblaciones de especies en peligro de extinción (Gomendio *et al.* 2006). Desde el 2000, los camélidos sudamericanos se han vuelto más populares a nivel internacional por la difusión de sus características productivas, incrementándose el interés en la aplicación de tecnologías reproductivas (Miragaya *et al.* 2006).

El desarrollo de técnicas de reproducción asistida en camélidos sudamericanos aún está considerablemente por debajo que en otros animales de granja y representan el esfuerzo de pequeños grupos de investigación alrededor del mundo (Ratto *et al.* 2013). Además, muchos de los trabajos realizados en Perú no están publicados en revistas científicas sino están como investigaciones de tesis en las bibliotecas de cada universidad o como resúmenes en congresos, dificultando el conocimiento real de los avances de las biotecnologías reproductivas en camélidos en el país.

### **2.2.1 Inseminación artificial**

La inseminación artificial (IA), particularmente con semen congelado, ha sido, de lejos, la biotecnología reproductiva más efectiva para la mejora genética selectiva en la producción de animales de granja (Adams *et al.* 2009), siendo una herramienta útil para diseminar las características de los macho con alto valor genético, contribuyendo sustancialmente en el mejoramiento genético de bovinos lecheros (Huanca 2012)

En alpacas, el desarrollo de la IA se limita al uso de semen fresco diluido e utilizado inmediatamente. Los primeros estudios fueron de Fernández-Baca y Novoa (1968) utilizando la inseminación transcervical, obteniendo solo 1 cría (tasa de natalidad: 2%). En ese mismo año, Calderón y colaboradores también inseminaron por vía transcervical, obteniendo una tasa de preñez de 46.6%. Estudios en llamas y alpacas por inseminación transcervical (Leyva *et al.* 1977) reportan una tasa de preñez de 39%. Bravo *et al.* (1997) realizan inseminaciones transcervicales y laparoscópicas, obteniendo una tasa de preñez de 68%. El CIP Quimsachata (INIA, Puno) (Desco 2017) reporta un porcentaje de fertilidad de 43.4% en alpacas con semen fresco diluido. En un contexto de crianza en comunidades campesinas se reporta una tasa de fertilidad de 62% y tasa de natalidad de

48.2 % (Descó 2017). Huanca *et al.* (2007) obtienen resultados cercanos al 50% de tasa de preñez. Apaza *et al.* (2011) reportan una tasa de preñez de 51% vía transcervical. García *et al.* (2017) comparan el efecto de utilizar dos tipos diferentes de yemas de huevo (fresca vs polvo) a diferentes temperaturas de refrigeración, obteniendo tasas de preñez similares cuando la inseminación se realizó con semen fresco (50 vs 46.7%), a 15°C (43.3 vs 40%) o a 5°C (33.3 vs 30%), respectivamente.

### **2.2.2 Ovulación múltiple y transferencia de embriones**

El pobre éxito en la técnica de transferencia de embriones puede estar relacionado a la alta variabilidad en la respuesta a los protocolos de superovulación y a la baja tasa de recuperación embrionaria. Otra mayor limitación es la recuperación de embriones eclosionados, siendo este estadio negativo para la manipulación y criopreservación de embriones. Muchos de los protocolos de superovulación han sido extrapolados de otros desarrollados en vacunos y ovejas a pesar de que el tipo de ovulación de los camélidos es diferente. A pesar de los esfuerzos para mejorar los protocolos de superovulación en llamas y alpacas, la respuesta ovárica sigue siendo frustrante variable (Ratto *et al.* 2013).

El primer reporte en transferencia de embriones fue realizado por Sumar *et al.* (1974), evidenciando la factibilidad de la aplicación de la técnica, pero con las desventajas anteriormente mencionadas. Igualmente, Del Campo *et al.* (1995) obtienen variabilidad en la respuesta ovárica y en número y calidades de los embriones. En el 2004, los resultados de un estudio (Huanca 2004) indican que después de la aplicación de un protocolo de superovulación, se observó el crecimiento de 7.5 folículos en alpacas, pero solo se pudo recuperar 1,4 embriones por alpaca. Vivanco *et al.* (2014) obtiene una tendencia de las alpacas a repetir su respuesta superovulatoria entre colecciones sucesivas y una comprobada repetibilidad en su producción de embriones transferibles entre colecciones.

### **2.2.3 Fertilización *in vitro***

Los primeros trabajos de investigación en fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos se han realizado utilizando gametos recuperados de animales beneficiados. Estos trabajos han sido de valiosa ayuda para intentar estandarizar protocolos de maduración y fecundación *in vitro*. Sin embargo, aún no se ha determinado

el tiempo de maduración in vitro de ovocitos de alpacas y llamas, los últimos trabajos de investigación apuntan a que se requieren alrededor de 40 horas para obtener altas tasas de ovocitos en metafase II. Se han realizado diversos trabajos de fecundación in vitro de ovocitos de alpacas y llamas, aún no existe un protocolo definido que permitan obtener altas tasas de segmentación y blastocistos, sin embargo, ya se han reportado gestaciones en alpacas y llamas y el nacimiento de una llama la primera cría por fecundación in vitro (Ruiz 2015).

## **2.3 Fisiología reproductiva de la alpaca hembra**

### **2.3.1 Anatomía**

El aparato reproductor de la alpaca hembra, al igual de las otras hembras, consta de un par de ovarios, oviductos, útero, vagina y vulva.

Los ovarios son de forma globular irregular, similar a los de la marrana, particularmente cuando tienen varios folículos (Sumar 1996). Miden 1.5 cm de longitud, 1.2 cm de ancho y 0.9 cm de profundidad (Sato y Montoya 1990). Están rodeados por una bursa ovárica, que se forma por un pliegue del mesosalpinx (Bravo *et al.* 2000).

Los oviductos son largos ( $20,4 \pm 4,2$  cm), tortuosos, finos y bastantes firmes y se pueden palpar con facilidad. La porción final es el itsmo, que actúa como un esfínter para evitar movimientos retrógrados de los fluidos contenidos en el útero (Sumar 1983).

El útero es de tipo bicorne y presenta cuernos, cuerpo y cérvix. Los cuernos están separados por un septo, siendo el cuerno izquierdo ligeramente mayor que el derecho, en un 90 % de casos fue encontrado ser el más irrigado. El cuerpo es de forma tubular aplanada dorsoventralmente y con una túnica mucosa lisa (Sato *et al.* 1988). La cérvix es estrecha, formada por 3 o 4 pliegues espirales que dan la apariencia de ser 2 o 3 anillos (Smith *et al.* 1994).

La vagina tiene una longitud de 13 y 15 cm y su diámetro es de 3,5 a 5 cm aproximadamente y se caracteriza por ser una estructura extensible que tiene una mucosa que forma numerosos pliegues (Sumar 1985, Fowler 1989). El himen, o sus restos, marcan la separación entre la vagina y la vulva.

La vulva puede medir 3 cm. y el clítoris es muy pequeño (Bravo *et al.* 2000). La mucosa presenta ligeros pliegues longitudinales. El fornix vaginal de 0.5 a 1 cm de profundidad se proyecta hacia la porción vaginal del útero (Bustinza 2001).

### **2.3.2 Pubertad**

La pubertad se caracteriza por la producción de gametos y la expresión de receptividad (celo). El inicio de la pubertad está regulado por el eje hipotálamo- hipófisis-gonadal (Hafez 2002). La madurez sexual en las alpacas hembra se da alrededor de los 2 años, siendo importante que el animal alcance el 60% del peso corporal de un adulto, lo que supone unos 33-36 kg (Sumar 1985). El comportamiento sexual de las hembras primerizas o de un año se manifiesta con la sumisión al macho (Bustinza 2001).

### **2.3.3 Estacionalidad**

La estacionalidad en las alpacas sigue siendo un tema controversial. Por algunos autores, la alpaca es considerada como una especie de actividad reproductiva estacional en condiciones naturales, que tiene lugar entre los meses de Enero a Abril (Bustinza 2001), siendo estos meses más cálidos del año donde hay lluvias y abundante forraje verde (Sumar 1996). En el caso de los machos, son capaces de producir eyaculados fértiles todo el año, pero al igual que en otras especies domésticas, la calidad del semen, así como la libido, se ven influenciados por la estación del año y disponibilidad de alimento (Montalvo *et al.* 1979). En contraste, Sumar (2000) considera que las alpacas pueden reproducirse durante todo el año y por eso son consideradas como reproductores no estacionales. Se ha señalado que la actividad ovárica en alpacas se produce a lo largo de todo el año y que la estación no afecta el número de folículos > 6 mm observados en los ovarios (Bravo y Sumar 1989).

Los factores responsables del inicio y término de la actividad reproductiva en condiciones naturales de la crianza no son bien conocidos (Sumar, 1996). Sin embargo, más allá de los factores nutricionales o de manejo, se cree que factores ambientales como la temperatura, humedad y luz, así como estímulos visuales u olfatorios tienen influencia en los centros del sistema nervioso central que controla el comportamiento reproductivo (Brown, 2000).

Fernández-Baca *et al.* (1972) estudiaron el efecto de la “asociación continua” entre hembras y machos en una misma punta por más de 15 días. Como resultado, se documentó que existe una inhibición en el interés sexual de los machos. Este hecho ha sido reproducido tanto en machos enteros como vasectomizados y, solo al momento de cambiar a las hembras, se elimina la inhibición, reiniciándose la actividad copulatoria (Fernández-Baca *et al.* 1972). En las puntas donde machos y hembras están juntos todo el año es evidente la presencia de este efecto inhibitorio, esto explicaría la estacionalidad reproductiva bajo tales condiciones a pesar de que las alpacas son sexualmente activas durante todo el año cuando los individuos de ambos sexos se mantienen separados (Novoa 1991).

#### **2.3.4 Tipo de ovulación y cópula**

En general, las hembras se clasifican de acuerdo con el proceso de ovulación que experimentan, clasificándolas en ovuladoras espontáneas u ovuladoras inducidas. Esto se debe si la liberación del óvulo se produce por un control endocrino de la hembra o si es necesario un estímulo externo para su realización.

Los camélidos sudamericanos son especies de ovulación inducida, por lo tanto, no presentan ciclos estrales definidos. No obstante, tienen periodos de receptividad sexual bastante prolongados durante la época de apareamiento y en ausencia de machos pueden durar hasta los 36 días presentando breves interrupciones que no sobrepasan las 48 horas (San Martín *et al.* 1968). Cuando la hembra es receptiva a la monta, no siempre está ligada a la presencia de un folículo dominante. Este comportamiento puede darse por la agresividad y sometimiento del macho a la hembra (Bravo y Jhonson 1994).

El comportamiento sexual demostrado por los camélidos sudamericanos machos puede ser dividido en dos fases: cortejo y cópula. Las hembras no preñadas están en estro continuamente y cuando los machos son introducidos al rebaño, ellos van a intentar aparearse con la primera hembra receptiva que encuentren, mediante la detección de feromonas usando la respuesta “flehmen”. Las observaciones en campo han mostrado una conducta peculiar de la alpaca macho. Esta muestra una actitud activa y en ocasiones agresiva durante el apareamiento, en contraste con la actitud pasiva de la hembra (Sumar 2000).

El proceso de la cópula en los camélidos es único, por muchas razones: duración de la cópula, tiempo de eyacuación, lugar de depósito del semen, y comportamiento del macho (Bravo 2002). Esta fase ocurre cuando la hembra adopta la posición de cópula en decúbito ventral con las extremidades inferiores metidas debajo del cuerpo (England *et al.* 1971). El macho cubre a la hembra, apretando los hombros de la hembra con sus codos, y su metatarso lo apoya en el suelo, lateral a los de la hembra (Novoa 1970). El pene se vuelve rígido, y el proceso uretral empieza a realizar movimientos semi-rotativos. Cuando la vulva es localizada, el macho se acerca más a la hembra, y posiciona sus corvejones paralelos a los de ella. Además, la espalda del macho está es recta; sin embargo, cuando ya se dio la penetración, la espalda del macho se encorva y la región sacra del macho se coloca en una posición vertical y muy cerca al perineo de la hembra (Bravo *et al.* 2002). El macho muestra su excitación mordiendo las orejas de la hembra, con su cola moviéndose de arriba para abajo, la dilatación y contracción de los ollares y la vocalización (Novoa 1970). El sonido gutural característicos de los machos durante el empadre es un aspecto integral en la liberación de la LH preovulatoria (Bravo y Jhonson 1994). La duración de la cópula es determinada por el macho, y puede durar de 5 a 50 minutos (promedio de 25 minutos). La competencia entre machos acortará el tiempo, especialmente cuando un grupo de machos están montando a varias hembras, como ocurre en Perú (Bravo *et al.* 2002).

El macho penetra la cérvix con el pene, y va depositando el semen continuamente en los dos cuernos uterinos usando leves movimientos de empuje, como lo confirma un trabajo de palpación uterina vía laparotomía durante la cópula (Franco *et al.* 1981; Bravo *et al.* 2002; Bravo y Jhonson 1994).

### **2.3.5 Crecimiento folicular**

Mediante el uso de ultrasonografía, se ha podido determinar que las alpacas hembra, en ausencia de cópula, muestran oleadas de crecimiento folicular de manera continua, de manera similar a lo observado en otras especies domésticas (Vaughan *et al.* 2001). Pero a diferencia de otras especies, no se producirá la ovulación, por lo tanto, no se dará la formación de un cuerpo lúteo, de tal forma que el folículo dominante se llega a atresiar (Sumar 2000). Por lo tanto, en el crecimiento folicular, se distinguen las fases de

crecimiento, estática y regresión. Cada etapa dura 4 días en promedio, siendo el tiempo total de la onda folicular 12 días (Bravo y Sumar 1989).

En la fase de crecimiento, podemos apreciar el reclutamiento o emergencia de la onda folicular, caracteriza por el crecimiento de un grupo de folículos antrales de 2 a 3 mm hasta alcanzar un diámetro de 4 a 5 mm. A partir de este momento se establece la selección, que permite que uno de los folículos continúe creciendo, mientras que el resto sufre atresia (Adams *et al.* 1989).

En la fase de estática, el folículo dominante (diámetro entre 7–12 mm) inhibe el crecimiento de nuevos folículos en ambos ovarios, probablemente, a través de la secreción de inhibina (Tibary 2001). Se ha comprobado la existencia de una correlación positiva entre el tamaño del folículo dominante y las concentraciones plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol y urinarias de sulfato de estroma, tanto en alpacas como en llamas (Bravo y Jhonson 1994, Chaves *et al.* 2002), siendo, en alpacas, la mayor concentración de estradiol cuando el folículo adquiere su diámetro máximo a los 8 días del inicio de la oleada de crecimiento (Vaughan 2001). Existe alternancia entre los ovarios para las oleadas foliculares (Adams *et al.* 1990, Vaughan *et al.* 2004). La presencia de un cuerpo lúteo en el ovario sea de ciclo o de gestación, no afecta al número de folículos en crecimiento (Del Campo *et al.* 1995).

En la fase de regresión, como se mencionó anteriormente, el folículo dominante, al no haber cópula, se atresiará.

### **2.3.6 Endocrinología de la ovulación**

Para que pueda ocurrir el mecanismo de la ovulación, se requiere de un pico preovulatorio de LH. Además, para que se de este proceso fisiológico, debemos recordar que existen hembras de ovulación espontánea y ovulación inducida. En los animales de ovulación espontánea se va a producir un efecto estimulador mediante las altas concentraciones de estradiol producido por el folículo dominante sobre el eje hipotálamo-hipófisis, en bajos niveles de progesterona. Las ovuladoras inducidas, como las conejas, hurones hembra, gatas, camellos hembra, llamas hembra y alpacas hembra, necesitarán un estímulo externo (cópula) para poder liberar el ovocito proveniente del folículo.

En el eje hipotálamo-hipófisis-ovárico, la hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH es la hormona clave que controla la función reproductiva en todas las especies vertebradas. Su principal acción, en ovuladoras inducidas, es la activación de las neuronas noradrenérgicas del cerebro medio y del encéfalo como consecuencia a las señales somatosensoriales genitales generadas por la cópula (Hafez y Hafez 2002).

La descarga preovulatoria de LH altera la estructura y función del folículo preovulatorio antes de que se produzca la ovulación, provocando la maduración del ovocito, la expansión de las células del cúmulo y la ruptura de la pared folicular. El pico de LH estimula también la producción de PGF2 $\alpha$  en el ovario la cual produce la contracción de la musculatura lisa del ovario provocando la liberación de los lisosomas de las células de la granulosa deteriorando aún más el tejido conectivo que envuelve la zona del ápex folicular. Todos estos mecanismos producirán la rotura de la pared del folículo y la consecuente liberación del ovocito.

Fernández-Baca (1970) realiza un estudio en llamas, demostrando la existencia de un incremento significativo de los niveles plasmáticos de LH entre los 15 a 40 minutos después del inicio del coito, como consecuencia de un reflejo neuroendocrino. Los estímulos neuronales que desencadenan dicho reflejo involucran la estimulación del cérvix durante la penetración, los sonidos emitidos por el macho y el contacto físico. Otro estudio similar es el de Bravo *et al.* (1990), en el cual el pico máximo de LH se presenta a las 2 ó 3 horas de la monta, retornando a niveles basales al cabo de 7 a 12 horas de la misma. Años más tarde, se ha determinado la presencia en el semen de un factor inductor de la ovulación de naturaleza proteica de una masa molecular de 14 KDa, y 12-23 AA, cuyo efecto es luteotrópico (Chen *et al.* 1984, Ratto *et al.* 2013).

En alpacas, la ovulación requiere un folículo dominante con un diámetro mayor a los 6 mm y se encuentre en fase de crecimiento (Adams *et al.* 1990). Cuando el diámetro folicular es menor o el folículo se encuentra en fase de regresión, la ovulación no se produce (Bravo *et al.* 1991). La ovulación se produce con similar frecuencia en ambos ovarios (Fernández-Baca *et al.* 1970).

Luego del pico de LH, comienza el proceso de luteinización. Las células de la granulosa modificarán la secreción celular de estrógenos a progesterona. Según los estudios de Sumar (1996), tras la descarga de LH, se observará un aumento de los niveles de esteroides, pasando de 100-200 pg/ml a más de 700 pg/ml) y, posteriormente, descenderá a partir de las 18 horas postcópula (Bravo *et al.* 1990).

El intervalo entre la emergencia de dos oleadas de crecimiento folicular consecutivas difiere en las distintas especies de camélidos siendo de 12 a 16 días en alpacas (Vaughan *et al.* 2004), 18 días en llamas (Adams *et al.* 1990, Chávez *et al.* 2002). No obstante, Bravo y Sumar (1989) observaron que el intervalo entre la presencia de dos folículos dominantes sucesivos era de 11–12 días tanto en alpacas, como llamas.

Algunos estímulos físicos, auditivos, olfatorios o visuales pueden inducir la ovulación, pero su efectividad es considerablemente inferior a la de los estímulos coitales. En estas circunstancias se habla de ovulaciones espontáneas, siendo su presentación inferior al 5-10% y observándose preferentemente durante el postparto (Bravo y Sumar 1989). Fernández-Baca *et al.* (1970) demostraron que la cópula con machos enteros o vasectomizados provocaba la ovulación 77–82%, mientras que en los casos en los que se producía la monta sin intromisión el número de ovulaciones eran muy bajo. En el caso de la ovulación espontánea, un estudio realizado en alpacas señala que se produce en el 3,5% de los folículos mayores de 6 mm (Bravo y Sumar, 1989).

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

gestaciones se localicen en el cuerno izquierdo (Fernández-Baca *et al.* 1970). Tampoco se ha podido comprobar que el ovario de procedencia del ovocito tenga ningún efecto en la probabilidad de que se produzca una gestación (Vaughan *et al.* 2003).

### **2.3.7 Métodos artificiales de inducción de la ovulación**

En los animales de granja es común aplicar protocolos hormonales para poder manipular sus ciclos ováricos. Esto da como resultado la sincronización de sus ondas foliculares para poder determinar el momento exacto de la ovulación y realizar la inseminación artificial o poder realizar lavados uterinos para la recuperación de embriones y su posterior transferencia.

Las alpacas y llamas pueden ovular sin el estímulo exógeno de la cópula, mediante inyecciones de hCG (hormona gonadotropina coriónica humana) que tiene acción similar a LH. Esto lo demuestra el estudio de Fernández Baca *et al.* (1970), los cuales utilizan una dosis de 10 a 1600 UI de hCG administrada vía endovenosa que produjo la ovulación 24 horas después de la aplicación. La ovulación también puede ser inducida exitosamente por una inyección directa de 1 mg de LH o por 4.8 mg de GnRH (Sumar 1985). De forma similar Bravo *et al.* (1990) señalan que 750 UI de hCG fue suficiente para inducir ovulación en 100% de alpacas y 80 – 800 µg de GnRH provocaron la ovulación en 80% de llamas y alpacas.

Otros estudios indican que en el semen existe un factor que puede inducir la ovulación en alpacas. Ríos (1989) realizaron un estudio donde colocaron el semen de alpaca en el fornix vaginal de alpacas. Esto trajo como consecuencia la inducción de la ovulación en el 53% de las hembras. Más adelante, se confirma la presencia de un factor inductor de ovulación en el plasma seminal de camélidos sudamericanos que provoca un incremento en las concentraciones de LH e induce una respuesta ovulatoria y luteotrópica en más del 90% de animales tratados. (Adams *et al.* 2005).

## **2.4 Evaluación de la reserva ovárica**

La definición del término “reserva ovárica” aún no está bien precisada. Estrictamente, correspondería a la cantidad de folículos primordiales presentes en ambos ovarios, pero

esto solo se podría examinar mediante cortes histológicos por el pequeño tamaño que presentan.

En una nueva onda folicular, un grupo de folículos primordiales será reclutado, por lo tanto, éstos iniciarán la foliculogénesis en el ovario, evolucionando a folículos primarios, secundarios o preantrales, no identificables por ecografía. Una proporción de éstos llegará a la etapa de folículos antrales pequeños, los cuales son sensibles a las hormonas gonadotropinas y ya son identificables mediante ecografía. Solo uno de estos folículos, en el caso de las especies de una sola cría, alcanzará la dominancia y llegará a su última etapa como folículo preovulatorio (Lonegro *et al.* 2016).

Los folículos antrales pequeños son los primeros estadios sensibles a la FSH, por lo que nos pueden ayudar a predecir la respuesta a los protocolos de superovulación y es factible su cuantificación mediante la ultrasonografía o por marcadores hormonales. Por esta razón, muchas investigaciones consideran a los folículos antrales pequeños como parte de la reserva ovárica, los cuales se correlacionan con la fertilidad del individuo (Silva-Santos *et al.* 2013).

#### **2.4.1 Conteo de folículos antrales**

El conteo de folículos antrales (AFC) es un método directo, económico y fácil de realizar para cuantificar solo los folículos con cavidad antral. Burns *et al.* (2005) demuestran que el uso de la ultrasonografía es un método confiable para contabilizar la cantidad de folículos antrales mayores de 3 mm de diámetro, teniendo una alta variación entre las vacas, pero alta repetibilidad en el mismo individuo. Ireland *et al.* (2008) muestran en su investigación que el AFC puede predecir el número de ovocitos morfológicamente sanos y la cantidad de folículos en novillas.

Varias investigaciones relacionan el AFC con las concentraciones de la hormona antimülleriana (AMH). Torres-Rovira *et al.* (2014) demuestra que el conteo de folículos antrales y la hormona antimülleriana están correlacionados positivamente con la cantidad de folículos post estimulación hormonal. En mujeres, la variación del conteo folicular se evidencia en la fluctuación de la concentración de la hormona antimülleriana (Depmann *et al.* 2016).

La evaluación del AFC es de vital importancia porque estima la respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación, ayudando a predecir la capacidad reproductiva de mujeres y animales.

#### **2.4.2 Marcadores hormonales**

Existen diferentes marcadores hormonales que se correlacionan con la cantidad de los folículos en crecimiento. Una manera de clasificarlos sería por producción directa o indirecta. En las directas, están consideradas las que se producen durante el desarrollo folicular, independientemente de la estimulación folicular (inhibina B y hormona antimülleriana). En las indirectas, se basa en la producción de hormonas a través del proceso de retroalimentación (FSH, LH y estradiol).

##### **a. Hormona folículo estimulante**

La hormona folículo estimulante (FSH), es una hormona glucoproteica, con un peso molecular de 37.300 Daltons (Grimek *et al.* 1979). Consta de dos subunidades distintas: una subunidad  $\alpha$ , estructuralmente similar a la hormona luteinizante (LH), y una subunidad  $\beta$ , responsable de su actividad biológica. FSH se produce en células gonadotrópicas de la región central de la hipófisis anterior, y su síntesis y secreción está regulada por señales neurales y gonadales (Padmanabhan *et al.* 2002).

FSH es necesaria para el crecimiento de folículos antrales. Las células de la granulosa se dividen por mitosis incrementando las capas que rodean al ovocito I y aumentando el tamaño folicular. Además, juntamente con la LH, ayudan a la síntesis de estradiol mediante la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa (Gigli *et al.* 2006). A su vez, estos niveles mayores de estradiol inducen a la glándula pituitaria que produzca menos FSH (retroalimentación negativa) (Kumar *et al.* 1999). La FSH también está involucrada en una mejor nutrición del folículo dominante, pues ayuda a aumentar su vascularización (Gigli *et al.* 2006).

López *et al.* (2005), estudió las concentraciones séricas de FSH con la cantidad de folículos dominantes que se pueden desarrollar en vacunos, encontrando una correlación positiva entre ambos, a diferencia de otro estudio (Ireland *et al.* 2007) que demuestra una relación inversamente proporcional entre la concentración de FSH y el número de folículos totales durante la onda folicular en vaquillas. Otros estudios reportan que el aumento de la concentración sérica de FSH está asociados con el agotamiento de la reserva ovárica, disminución de la capacidad de respuesta a la estimulación de gonadotropinas, reducción en el éxito de la FIV o disminución de la fertilidad durante el envejecimiento ovárico en las mujeres (Scheffer *et al.* 2003) y en bovinos (Malhi *et al.* 2005).

La gran desventaja de utilizar FSH como un marcador de la reserva ovárica es su alta variabilidad durante la onda folicular y entre ondas foliculares del ciclo menstrual (Kwee *et al.* 2004), lo que se asume que también se daría en un ciclo estral. Para protocolos de superovulación, una desventaja es la vida media de esta hormona (110 minutos), lo que obliga a realizar aplicaciones repetidas para conseguir una buena estimulación ovárica (Moor *et al.* 1984).

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

## **b. Hormona Inhibina**

La inhibina es una glucoproteína heterodimérica producida por las células de la granulosa del folículo dominante. Están formadas por la unión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La unión de la subunidad  $\alpha$  con la subunidad  $\beta$ A, forma la inhibina A. La unión de la subunidad  $\alpha$  con la  $\beta$ B, forma la inhibina B. Su acción es paracrina, inhibiendo el crecimiento de los folículos subordinados. Además, actúan de forma sistémica, inhibiendo la secreción de FSH a nivel de la hipófisis, formando un circuito de regulación (Gigli *et al.* 2006).

La inhibina A es secretada principalmente por los folículos dominantes y el cuerpo lúteo, variando sus concentraciones a lo largo de la onda folicular (Robertson

2012). Por el contrario, la inhibina B es el producto de los folículos en desarrollo temprano. Welt (2002) señala una relación positiva entre la FSH y la inhibina A en el suero, mientras que, en la fase folicular, la inhibina B es inversamente proporcional a la FSH.

Fried *et al.* (2003) observó que la inhibina B en el fluido folicular y en el suero estaba altamente correlacionado con el número de ovocitos recuperados, pero no con el resultado de la fertilización *in vitro*. Por lo tanto, la inhibina B podría ser considerada marcador de la respuesta ovárica, pero no de la calidad de ovocitos o embriones (Revelli *et al.* 2009).

### **c. Hormona antimülleriana**

Los inicios del estudio de la AMH están relacionados con la diferenciación sexual en el embrión y fue por primera vez propuesto por Alfred Jost en 1947, siendo una sustancia inhibidora de los conductos de Müller (Josso *et al.* 2006), por eso también se le conoce como Sustancia Inhibidora de Müller (MIS). Es una glicoproteína (Budzik *et al.* 1980) perteneciente a la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF $\beta$ ) de los factores de crecimiento (Cate *et al.* 1986).

La producción de AMH se debe a las células que nutren, protegen y regulan las células germinales: las células de Sertoli de los testículos y las células de la granulosa del ovario. Esto sugiere que la AMH tiene papeles antiguos en la filogenia como un regulador de las células germinales. En hembras, es producida exclusivamente por células de la granulosa de folículos en crecimiento (preantrales y antrales pequeños) (Munsterberg y Lovell-Badge 1991). La AMH se expresa en los folículos que ya fueron reclutados, pero que aún no fueron seleccionados para ser dominantes. Previo y posterior a estos 2 puntos, la AMH no se expresa (Capece *et al.* 2016). Por lo tanto, la AMH indicaría la actividad de los folículos preantrales y antrales pequeños, posiblemente prediciendo la calidad de la reserva ovárica y la respuesta ovárica a los protocolos de superovulación (Figura 1). Además, en la foliculogénesis, regula el paso de los folículos primordiales hacia folículos primarios. Esto fue estudiado en ratones

*knockout*, en los cuales se observó que el pool folicular se agotó antes que en los ratones con el tipo común. De estos resultados, se concluyó que el reclutamiento de folículos primordiales es inhibido por la AMH (Durlinger *et al.* 1999).

Se ha identificado un receptor tipo II (AMHRII) y se ha demostrado ser específico y necesario para la señalización de AMH (Baarends *et al.* 1995). La función principal de estos receptores es la activación de los receptores tipo I, con los cuales se inicia la señalización *downstream* (Moustakas y Heldin 2009).

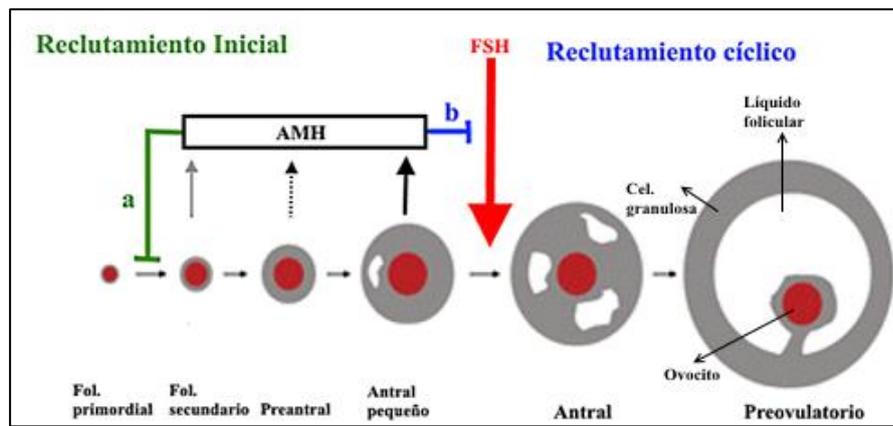


Figura 1: Secreción de AMH en el crecimiento folicular (Broekmans *et al.* 2008)

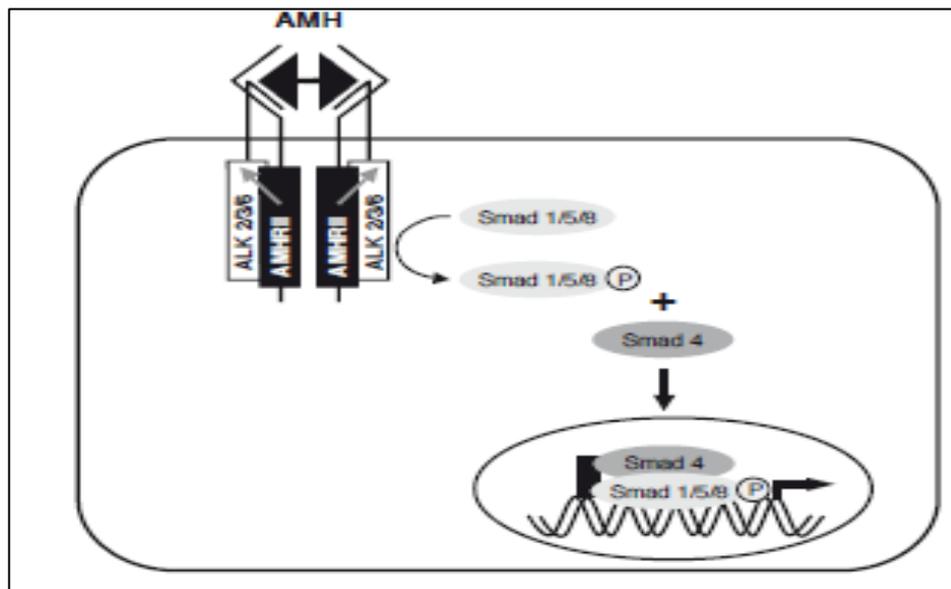


Figura 2: Vía de señalización de la AMH (Visser *et al.* 2005)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de estudio

La investigación se realizó entre los meses de enero y marzo del 2016 y noviembre a marzo del 2017 en el CIP Chuquibambilla de la Universidad Nacional de Altiplano (UNA), ubicado en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar y región de Puno, a 3920 m.s.n.m., 14°47'37" latitud sur y 70°47'50" longitud oeste (Figura 3). Las épocas de lluvia y seca son definidas con una precipitación máxima de 156 mm, mínima de 2 mm, la temperatura máxima 8.5 °C y mínima de -2 °C y humedad relativa de 67.8%.

El análisis de muestras se realizó en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), ubicado en el distrito de San Martín de Porres, en la ciudad de Lima.

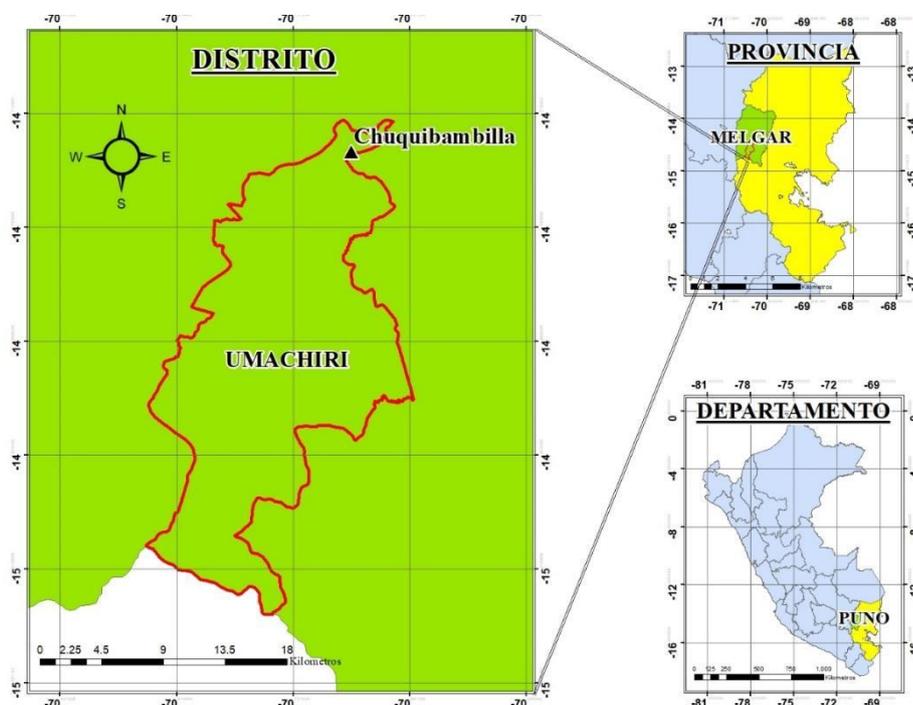


Figura 3: Ubicación espacial del C.I.P. Chuquibambilla

### **3.2 Materiales**

Los materiales, reactivos y equipos se presentan en el Anexo 1. Parte de los insumos y equipos de laboratorio estuvieron a disposición en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas (UPCH), Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas (Universidad Nacional Agraria La Molina, UNALM) y en el CIP Chuquibambilla (UNA), mientras que los reactivos y medicamentos fueron financiados por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC).

### **3.3 Animales**

Se utilizaron 52 alpacas suri, hembras, vacías, en edad reproductiva (3 a 7 años), en condición corporal entre 2.5 a 3.5 (Figura 4) y con la presencia de un folículo preovulatorio (diámetro  $\geq 7$  mm) determinado mediante ecografía transrectal del C.I.P. Chuquibambilla. Durante los estudios, las alpacas estuvieron en la misma punta y fueron pastoreadas en pastizales de condición regular y composición florística con especies de los géneros *Festuca*, *Muhlenbergia*, *Trifolium*, *Carex* y *Calamagrostis*.

	Grado	Descripción animal	Vista frontal	Vista trasera	Apófisis espinosa a transversa	Fosa paralumbar
Extremadamente flaca	1.0	Grasa o músculo no visible o palpable entre la piel y los huesos. Las costillas, las apófisis dorsales y transversales, y los huesos de la pelvis son individualmente prominentes. Pérdida extrema de masa muscular.	Esternón prominente en "V"	Intensa "V" invertida	Depresión profunda	Fosa muy hundida
Muy flaca	1.5					
Flaca	2.0	Ligera cobertura sobre la estructura ósea. Costillas y apófisis espinosas aún visibles y fácilmente palpables como marcadas. Menos pérdida de masa muscular.			Depresión obvia	Prominente
Moderada liviana	2.5		Nivelación gradual del esternón	Llenado gradual de "V"		
Moderada	3.0	Aspecto liso general. Ligera cobertura de grasa sobre las costillas y otros procesos óseos. Las costillas y las apófisis espinosas se pueden palpar con ligera presión. No hay pérdida de masa muscular.			Curva cóncava suave	Ligera
Moderada alta	3.5		Grasa moderada	Grasa moderada	Inclinación suave	
Gorda	4.0	Apariencia carnosa con cobertura visible de grasa. Presión de moderada a firme necesaria para palpar las estructuras óseas debajo de la piel.				
Muy gorda	4.5				Casi plano	Borde apenas distinguible
Obesa	5.0	Grasa excesiva cubre todo el cuerpo con una apariencia suave y redondeada. Las prominencias óseas no se pueden palpar, incluso con presión firme. Abundante grasa en torno a la inserción de la cola.	Esternón abultado en grasa	Area inguinal abultada en grasa	Redondeado	Desapercibido por la grasa

**Figura 4: Sistema de evaluación de condición corporal para llamas y alpacas (modificado de Cebra et al. 2014)**

### **3.4 Metodología experimental**

#### **3.4.1 Estudio I: Cuantificación de hormona antimülleriana por edades y entre grupos de alta y baja concentración**

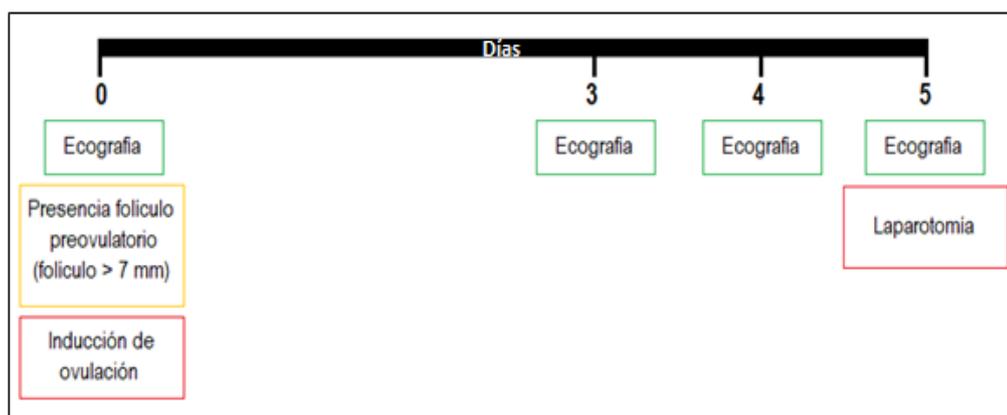
De la población total de alpacas del CIP Chuquibambilla, se seleccionaron alpacas suri hembras vacías, entre 3 a 7 años y mediante ecografía (Esaote Tringa, transductor lineal de 5 MHz) se detectó a las hembras que presentaban un folículo de tamaño mayor a 7 mm con ausencia de cuerpo lúteo en cualquiera de los ovarios, obteniendo 52 alpacas con estas características para el estudio. Luego, se sincronizó la ovulación con una dosis única de 1 ml (0.0042 mg) de un análogo a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Conceptal®, Intervet International GmbH, Alemania) vía intramuscular (Gonzales *et al.* 2011, Huanca 2008, Pacheco *et al.* 2016). Al día 5 postinducción, se tomó una muestra de sangre de la vena yugular mediante punción directa (Gómez *et al.* 2003) con un tubo al vacío de 3 ml con anticoagulante EDTA (Vacutainer® EDTA K2) y una aguja de 21 G de 1 x 1½ para inmediatamente ser centrifugadas (3000 RPM por 15 minutos). Terminado el proceso de centrifugación, se separó el plasma sanguíneo en microtubos de 2 ml, almacenándolo en una congeladora a -20°C. Las muestras fueron transportadas en una caja de poliestireno expandido con hielo seco hacia el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la UNALM y se almacenó en una congeladora a -20. El día del análisis, las muestras fueron transportadas en la misma caja de poliestireno expandido con bolsas de gel refrigerante hacia el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la UPCH, evitando romper la cadena de frío.

Se utilizó un kit comercial validado para alpacas por Céliz (2017) para realizar un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich de 96 pocillos (Rata y ratón AMH ELISA AL 113, Ansh Labs, USA) para poder cuantificar la concentración de AMH en plasma sanguíneo en ng/ml (1 ng/ml AMH = 7.14 pmol/L) mediante la detección colorimétrica por absorbancia del largo de onda con filtros de 450 nm y 630 nm, siendo el rango dinámico de 0.23 ng/ml a 15 ng/ml (especificaciones del fabricante). Las muestras se descongelaron una sola vez y, juntamente con los reactivos, se atemperaron a 20°C (temperatura ambiente). Los estándares, las muestras de plasma sanguíneo y el control negativo (plasma sanguíneo de ratón macho castrado) se evaluaron por duplicado. Las muestras en que el coeficiente de variación fue mayor de 15 fueron retiradas del estudio. La preparación de los reactivos, la preparación de las muestras y el procedimiento

de la prueba se realizaron según las indicaciones del fabricante. Para cuantificar la concentración de la hormona, se midió la absorbancia en un lector de Elisa. Después de obtener la concentración de AMH por cada alpaca, se evaluó el promedio de concentración de AMH por edades. Luego, los animales fueron separados según su concentración de AMH por cuartiles (cada grupo conformado por 9 o 10 animales) y se comparó los grupos extremos: baja concentración (animales por debajo del cuartil p1) y alta concentración (animales por encima del cuartil p3).

#### **3.4.2 Estudio II: Comparación de cantidad y tamaños de folículos entre grupos de alta y baja concentración de hormona antimülleriana**

De los grupos extremos, se seleccionó al azar 7 animales del grupo de baja concentración y 6 animales del grupo de alta concentración de AMH. Mediante ultrasonografía (Esaote Tringa, transductor lineal de 5 MHz), se evaluó por tres días consecutivos a estos animales para hacer el seguimiento de la onda folicular y, cuando presentaron un folículo preovulatorio (diámetro  $\geq 7$  mm), se indujo a ovulación con una dosis única de 1 ml (0.0042 mg) de un análogo a la GnRH (Conceptal, Intervet International GmbH, Alemania) vía intramuscular. Se realizó ecografías los días 3, 4 y 5 post inducción para confirmar la ovulación en base a la desaparición del folículo dominante detectado previamente y evaluar el crecimiento de los folículos. Al día 5, además, se realizó un procedimiento quirúrgico (Figura 5), utilizando la técnica de laparotomía medial caudal con un protocolo anestésico de ketamina-xilacina (más detalle en las secciones 3.5 y 3.6). Inmediatamente después que los ovarios fueron expuestos, se contaron y midieron los folículos con un calibrador de Vernier. La aspiración folicular se realizó con una aguja de 18G x 1 pulgada conectada a una jeringa totalmente de plástico de 5 ml con 1 ml de medio para colección de embriones (BioLife™ Advantage, Agtech, USA) atemperado a 37°C. Se procedió a aspirar los folículos de diámetro entre 3 a 7 mm. Cuando se completó la aspiración folicular en un ovario, el contenido de la jeringa se vació en una placa de Petri de 30 mm x 15 mm que contenía 2 ml del medio (BioLife™ Advantage, Agtech, USA) que estaba atemperada a 37°C en una placa térmica hasta su búsqueda. Luego, se realizó el mismo procedimiento en el otro ovario.



**Figura 5: Esquema experimental para las alpacas seleccionadas para cirugía**

### 3.4.3 Estudio III: Relación entre calidad de ovocitos con grupos de alta y baja concentración de hormona antimülleriana

Después del estudio II, se procedió a aspirar los folículos mayores a 3 mm y que en el seguimiento ecográfico no estaban atresiándose. Luego, se procedió a la búsqueda de los complejos cúmulus ovocito (COCs) con un estereoscopio, separándolos en una placa de 4 pocillos con 0.5 ml del medio a 37°C (BioLife™ Advantage, Agtech, USA) según la categoría que le correspondía. Los COCs se categorizaron por la compactación y capas de las células del cúmulus y la homogeneidad del ooplasma según la Tabla 1 (de Loos *et al.* 1992).

**Tabla 1: Categorización de los ovocitos**

Categoría	COCs
A	Varias capas (más de 3) de células del cúmulus Ooplasma homogéneo
B	Algunas capas compactas de células del cúmulus (2 a 3 capas) Ooplasma homogéneo, pero con una apariencia más oscura
C	Ovocito casi desnudo, con pocas células del cúmulus. Ooplasma irregular
D	Ovocito desnudo Ooplasma granulado

**FUENTE:** Adaptación de de Loos *et al.* 1989

### 3.4.4 Estudio IV: Cuantificación de la hormona antimülleriana en la onda folicular

Se seleccionó al azar 5 alpacas hembra suri, entre 5 y 6 años, con un folículo dominante y se indujo a ovulación según lo descrito en el Estudio 1. Se realizó el seguimiento ecográfico de la onda folicular y se tomó de muestras de sangre cada 4 días, realizando los mismos procedimientos en cuanto a colección, procesamiento, almacenamiento y análisis de muestras descrito en el Estudio 1. Después de obtener las concentraciones por alpacas, se relacionó con el crecimiento del folículo dominante (Figura 6).



Figura 6: Esquema del seguimiento de la onda folicular

## 3.5 Procedimiento quirúrgico

### 3.5.1 Preoperatorio

Se evaluó clínicamente a cada animal mediante su reseña (especie, raza, sexo y edad), la anamnesis (última fecha de parición, enfermedades previas, fecha de desparasitación), examen físico en reposo: auscultación, mensuración, evaluación de mucosas (Ccamá 2017), peso y condición corporal, estando aparentemente sanos. No se realizaron exámenes complementarios. Los animales estuvieron en ayunas de alimento y agua 24 horas previas a la intervención quirúrgica en un ambiente cerrado con techo, alejado de otros animales, sin ruidos. Mediante sujeción, se realizó la tricotomía de la región operatoria.

### 3.5.2 Trans operatorio

Realizada la anestesia, se colocó al animal en decúbito dorsal en una camilla para laparoscopia modificada para alpacas, dándole una inclinación de 30°, consiguiendo tener el tren posterior más alto que el tren anterior. Se realizó la antisepsia de la zona de

intervención, que constó de lavados con clorhexidina al 4% y el embrocado con alcohol yodado. Inmediatamente, se colocó los campos estériles y se realizó la técnica de laparotomía medial. Se monitorearon las constantes fisiológicas cada 5 minutos, manteniendo al animal dentro de los parámetros normales como temperatura corporal (38-39 °C), frecuencia cardíaca (60 – 80 latidos/minuto), frecuencia respiratoria (10-30 respiraciones/minuto) y mucosas (rosadas) (Lin y Walz 2014).

### **3.5.3 Postoperatorio**

La atención post operatoria consistió en un tratamiento con antibiótico con penicilina-estreptomicina 20/20 utilizando dosis de 1 ml/25 kg de peso vivo cada 24 horas durante 5 días. Para el manejo del dolor e inflamación se empleó diclofenaco sódico de 25 mg, utilizando una dosis de 1ml/25 kg de peso vivo cada 24 horas durante 5 días. El tratamiento tópico de la herida quirúrgica fue a base de fenol violeta hasta culminada la cicatrización de la herida quirúrgica de la piel. A los 10 días se procedió a retirar los puntos.

### **3.5.4 Técnica de laparotomía medial**

Antes de iniciar la técnica, se procedió a realizar un bloqueo local por infiltración en retirada (Arribas *et al.* 2001). Se realizó inyecciones de 0.5 ml del anestésico (lidocaína) sobre el tejido subcutáneo y la dermis de la línea de incisión, avanzando lentamente y cambiando la posición de la aguja para el sentido contrario, evitando así realizar varias punciones. Se realizó la incisión de 10 cm sobre la piel en la línea media, desde la cicatriz abdominal hasta aproximadamente 5 centímetros antes de la glándula mamaria.

Con la ayuda de una tijera de Metzembraum, se procedió a desbridar el tejido subcutáneo por divulsión estrellada hasta llegar a la línea alba, la cual se incidió hasta llegar al peritoneo, el cual también se incidió para poder localizar los ovarios y exteriorizarlos. Finalmente, el cierre de la cavidad abdominal se realizó en 4 planos: peritoneo, línea alba, tejido subcutáneo y piel (Espezúa *et al.* 2015, Mendoza *et al.* 2007)

### **3.6 Protocolo anestésico**

#### **3.6.1 Preanestesia**

Se realizó con xilacina a una dosis de 0.35 mg/kg intramuscular (IM) y se esperó que el animal bajara la cabeza para proceder a la inducción (Lin y Walz 2014).

#### **3.6.2 Inducción**

Se indujo con una dosis de ketamina de 5 mg/kg intravenosa (IV) (Espezúa *et al.* 2015, Lin y Walz 2014).

#### **3.6.3 Mantenimiento**

Se administró la mitad de la dosis de inducción en bolos repetidos (Espezúa *et al.* 2015) cuando el animal comenzaba a tener movimientos voluntarios. Además, se utilizó tramadol IM en una sola aplicación de 2 mg/kg (Lin y Walz 2014).

#### **3.6.4 Despertar**

A los pocos minutos del término de la cirugía, las alpacas se ponen de pie espontáneamente y al día siguiente, están consumiendo alimento y agua en forma normal (Cabrera *et al.* 1996).

### **3.7 Registro de información**

Toda la información recogida en cada una de las etapas del trabajo experimental fue anotada en una ficha individual para cada uno de los animales. Los datos recogidos fueron número y dimensiones de las estructuras presentes en el ovario en cada una de las exploraciones ecográficas, número y tamaño de folículos totales, número y calidad de ovocitos correspondientes a cada una de las categorías establecidas (Huanca 2008).

### **3.8 Análisis estadístico**

El software libre utilizado fue el R Statistical Project 3.2.1.1 y las librerías utilizadas fueron lme4, lsmeans y agricolae.

### 3.8.1 Descriptivo

De los animales muestreados, se retiró a los que dieron como resultado valores atípicos y a los que en las muestras pareadas tenían un coeficiente de variación mayor a 15 en la concentración de la hormona según el ELISA. Se hizo un estudio observacional de la concentración de AMH, se hicieron grupos según la edad y utilizando extremos de los cuartiles para concentraciones altas y bajas de AMH. El análisis descriptivo se hizo con estadígrafos como el promedio, máximos, mínimos y error estándar.

### 3.8.2 Modelo estadístico

Para el Estudio I, la variable respuesta fue concentración de la hormona AMH (ng/ml). El modelo lineal consideró como efecto fijo la edad (3, 4, 5, 6 y 7 años), siendo:

$$Y_{ij} = u + Edad_i + e_{ij}$$

Donde:

$$Y_{ij} = \text{Concentración de AMH}$$

$$u = \text{Promedio}$$

$$Edad_i = \text{Edad de las alpacas}$$

$$e_{ij} = \text{Residual}$$

Para el Estudio II, la variable respuesta evaluada fue el porcentaje de folículos por tamaños (< 3 mm, 3 – 7 mm y > 7 mm), ajustados a la distribución normal por la función arcoseno. El modelo lineal consideró como efecto fijo grupos de concentración de AMH (alta y baja), siendo:

$$Y_{ij} = u + AMH_i + e_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Porcentaje de folículos por tamaños

$u$  = Promedio

$AMH_i$  = Grupo de concentración de AMH

$e_{ij}$  = Residual

### **3.8.3 Comparaciones**

Para comparaciones entre las edades y entre los grupos alta y baja de la variable respuesta concentración de AMH se utilizó DLS con promedios ajustados. También, se realizó comparaciones entre los grupos de alta y baja concentración de AMH de las variables respuesta cantidad de folículos y porcentaje por tamaños de folículos utilizando LSD con promedios ajustados. Para relacionar la calidad de ovocitos con los grupos de concentración de AMH se usó la prueba de chi cuadrado.

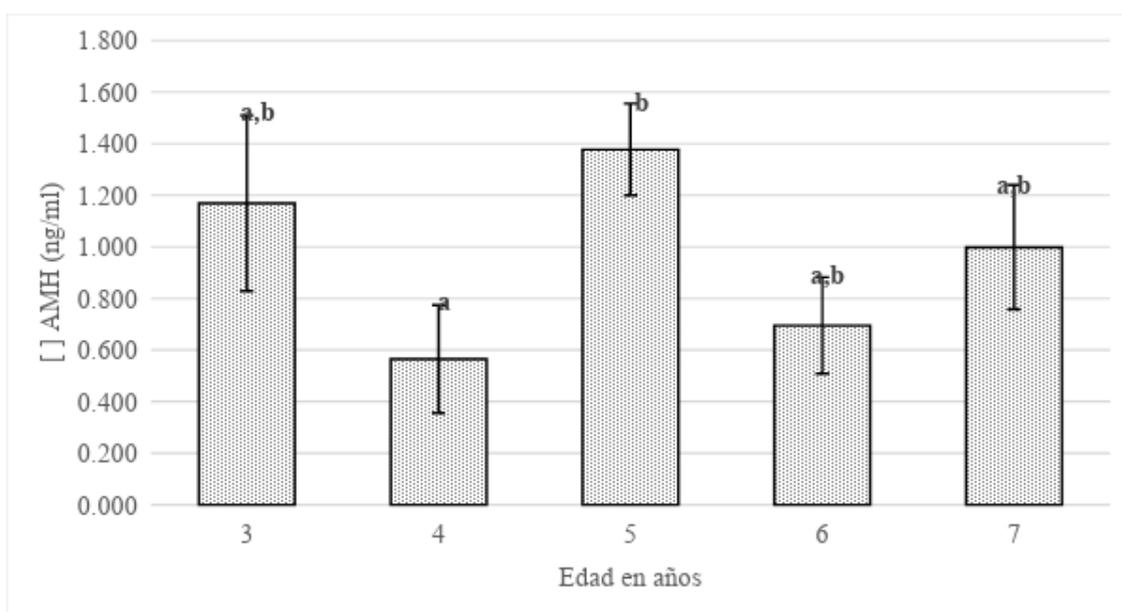
### **3.8.4 Correlación**

En el Estudio IV, para medir la relación lineal entre la concentración de AMH y el tamaño del folículo dominante, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson general y por individuo.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Estudio I: Cuantificación de hormona antimülleriana por edades y entre grupos de alta y baja concentración

De las 54 alpacas inicialmente muestreadas, no se consideraron algunos animales por la restricción que se hizo en la sección 3.4.1 del presente trabajo y a los que dieron como resultado valores atípicos en la concentración de la hormona, concluyendo con un total de 38 alpacas en el estudio. La concentración promedio de la AMH fue de 0.951 ng/ml con una desviación estándar de 0.648 ng/ml, con un rango mínimo de 0.296 ng/ml y un máximo de 2.573 ng/ml y una mediana de 0.69 ng/ml (Anexo 2 y 3). El error estándar fue de 0.105. Los datos no siguen la distribución normal ( $p=0.0001$ ). Además, se evaluó la concentración de AMH promedio por edades, encontrándose diferencias solo entre 4 y 5 años ( $p < 0.05$ ) (Figura 7, Anexo 4).



**Figura 7: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de AMH según edades en alpacas**

Los animales fueron divididos en cuartiles según la concentración de AMH en plasma sanguíneo: a) Grupo Alta (primer cuartil, 10 animales); b) Grupo Media-alta (segundo cuartil, 9 animales); c) Grupo Media-baja (tercer cuartil, 9 animales); y, d) Grupo Baja (cuarto cuartil, 10 animales). Dentro de los grupos, los datos siguen la distribución normal. El grupo alta y el grupo baja presentan diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0.0001$ ) en concentración de AMH ( $1.877 \pm 0.1$  ng/ml vs  $0.376 \pm 0.1$  ng/ml, respectivamente) (Anexo 5).

La AMH también ha sido medida en otras especies. En los estudios de Ebner *et al.* (2006) en pacientes mujeres, al día 3 del ciclo menstrual, la concentración de AMH fue de  $3.39 \pm 2.22$  ng/ml (rango: 0.13-10.37). También, El-Sheikh Ali *et al.* (2013) investigaron la concentración de AMH en plasma sanguíneo en vacas con ciclos estrales fisiológicos, siendo de  $0.09 \pm 0.003$  ng/ml (rango: 0.05-0.21). En corderos entre 35 y 40 días, la concentración de AMH fue  $0.93 \pm 0.42$  ng/ml (Torres-Rovira *et al.* 2014). Además, Céliz (2017) presenta valores máximos y mínimos en alpacas (3.129 ng/ml y 0.37 ng/ml) que son similares a los encontrados en este estudio. Por lo tanto, vemos que los rangos mínimos y máximos en la concentración de la hormona es bastante amplio en ovinos, alpacas y mujeres. Sólo en vacunos vemos que la diferencia es mínima, pudiéndose explicar que los autores trabajaron con un número menor de muestra que en los demás estudios mencionados.

La AMH disminuye conforme avanza la edad. En yeguas, la concentración plasmática varía profundamente entre diferentes grupos de edades de jóvenes (3-8 años), intermedias (9-18 años) y adultas (19-27 años), siendo la concentración media de AMH más baja en el grupo de las yeguas más viejas (0.21 ng/ml) comparado con las yeguas de edad intermedia (0.47 ng/ml) (Claes *et al.* 2015). También, en mujeres, el grupo que presentaba menor concentración de AMH ( $< 1.66$  ng/ml) era el que estaba formado por mujeres con mayor edad y con un periodo más largo de ausencia de hijos (Ebner *et al.* 2006). En los resultados obtenidos en nuestro estudio, se encontró diferencias significativas estadísticas entre las alpacas de 4 a 5 años. Contrariamente a lo esperado, las alpacas de 5 años tenían mayor concentración de AMH. Es difícil explicar este comportamiento de la hormona, pero asumimos en la gestación de las madres de estas alpacas de 4 años pudo haber restricción nutricional, limitando el desarrollo reproductivo prenatal.

A pesar de que la AMH se ha comenzado a evaluar en animales de producción hace más de 10 años, aún no se ha encontrado el límite exacto de concentración para poder diferenciar los animales que responderán adecuadamente a los protocolos de superovulación. En consecuencia, algunos investigadores agrupan a los animales según la concentración de AMH, utilizando sólo los grupos extremos para poder comparar con otras variables, como cantidad de folículos y calidad de ovocitos. Esto se evidencia en las investigaciones en vacunos de Gamarra *et al.* (2015) y Gamarra *et al.* (2014). Aparte, Ebner *et al.* (2006) en mujeres, separa a las pacientes en tres grupos basándose en los percentiles 25 y 75 según la concentración de AMH. Otras investigaciones prefieren utilizar el conteo de folículos antrales como indicador para poder agrupar a los animales y recién relacionarlos con la concentración de AMH (Torres-Rovira *et al.* 2014). En nuestro caso, por ser uno de los trabajos pioneros de esta hormona en alpacas, preferimos dividir a los animales en cuartiles según la concentración de AMH, sólo utilizando los grupos extremos de AMH. Esto nos aseguraba que los grupos estén muy bien diferenciados, pero nos da el inconveniente que no podemos dar un aproximado del límite de concentración de AMH para predecir que alpacas tendrían mayor cantidad de folículos y ovocitos, como se explicará más adelante.

En el presente estudio, se obtuvo dos resultados atípicos en la concentración de AMH, siendo éstas concentraciones de 13.3 y 5.28 ng/ml. Diversos estudios determinan que altas concentraciones de AMH están relacionadas con el tumor de las células de la teca y granulosa en ovarios en vacas (El-Sheikh Ali *et al.* 2013, Kitahara *et al.* 2012) y en yeguas (Claes y Ball 2016). También, en humanos, la AMH elevada es un indicador para diferentes tumores en el ovario en niñas (Silverman y Gitelman 1996). En alpacas aún no hay evidencia de relación entre AMH y tumores ováricos, pero se vio la necesidad de separar a estos animales del estudio.

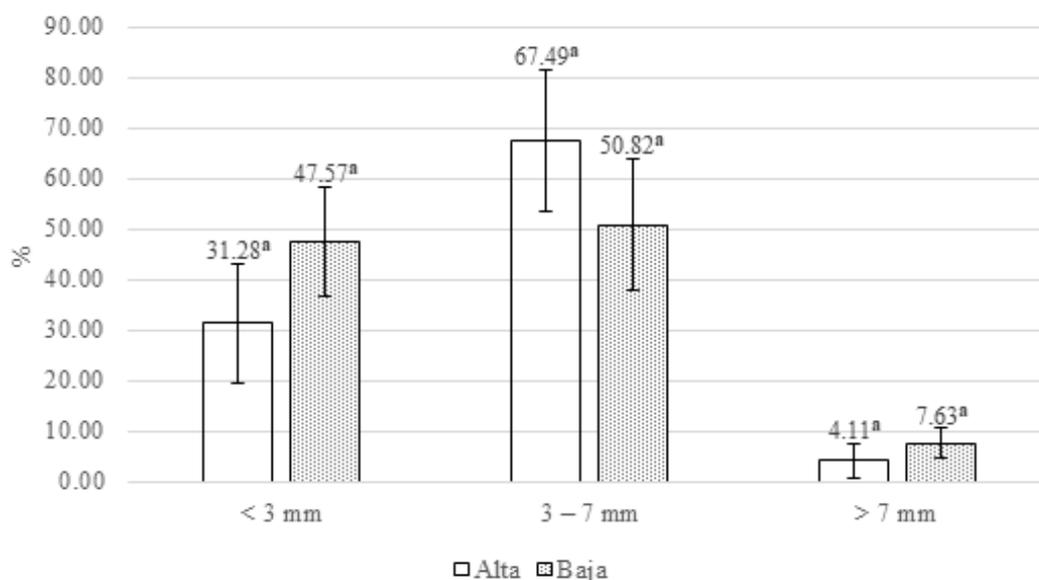
Otro punto para discutir es el día que se tomó la muestra de sangre. En la fecha de la experimentación, aún no existía información de AMH en alpacas. Por teoría, el inicio de una nueva onda folicular en ciclos estimulados empieza 24 horas después de la aplicación hormonal, con la ovulación del folículo dominante. La duración de la fase de crecimiento es, aproximadamente, 4 días (Bravo y Sumar 1989). En consecuencia, se tomó la muestra de sangre al día 5 post sincronización, pues se aseguraba reconocer la ovulación mediante

ecografía y obtener folículos en crecimiento de un tamaño aceptable para facilitar la aspiración y aún no contar la presencia de un folículo dominante.

#### 4.2 Estudio II: Comparación de cantidad y tamaños de folículos entre grupos de alta y baja concentración de hormona antimülleriana

De los grupos de alta y baja concentración de AMH, se realizó una laparotomía medial a 6 y 7 animales, respectivamente. Se contó los folículos en ambos grupos, teniendo un promedio general de 15.69 folículos por alpaca. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el grupo de alta y baja concentración ( $20.51 \pm 2.76$  folículos vs.  $11.58 \pm 2.55$  folículos, respectivamente;  $p < 0.05$ ).

Además, se comparó la proporción de los tamaños de los folículos entre ambos grupos (alta y baja), dividiéndose los folículos en tres tamaños: a) menores a 3 mm, b) entre 3 a 7 mm y, c) mayores a 7 mm. No se encontró diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tamaños de folículos (Figura 8, Anexo 6).



**Figura 8: Comparación entre grupos de alta y baja concentración de AMH en relación con el porcentaje de tamaño de folículos**

Gamarra *et al.* (2015) realizó un estudio en vacas, separándolas en dos grupos de los que tienen mayor y menor concentración de AMH. Según los resultados, se encontraron diferencias entre las cantidades de folículos en los grupos control de alta y baja concentración ( $9.8 \pm 1.8$  vs  $6.5 \pm 2.0$ , respectivamente), contándose mayor cantidad de

folículos en el grupo de alta concentración de AMH. Además, encontraron mayor cantidad de folículos de 2 – 3 mm en el grupo de alta AMH con respecto al de baja AMH ( $7.6 \pm 0.6$  vs  $5.1 \pm 0.7$ , respectivamente). Otra investigación en vacunos es la de Batista *et al.* (2014), encontrándose diferentes cantidades de folículos en la emergencia de la onda folicular en los grupos de baja y alta concentraciones en Holstein ( $13.4 \pm 1.4$  vs  $34.3 \pm 3.12$ ) y en Nelore ( $28.4 \pm 2.15$  y  $48.1 \pm 2.33$ , respectivamente).

Como se mencionó anteriormente, el AFC es un método directo para cuantificar folículos con cavidad antral. Celiz (2017) obtiene una correlación positiva ( $r=0.6$ ) entre el número de folículos antrales y la concentración de hormona antimülleriana por alpaca estudiada. Esta correlación positiva también observó Ireland *et al.* (2008) al analizar el conteo de folículos antrales mediante ultrasonografía en ovarios de vacunos, concluyendo que existe una correlación positiva entre la AMH y la población de folículos antrales. En ovinos, una investigación divide a sus animales según el conteo de folículos antrales, dando como resultado que los niveles plasmáticos de AMH estuvieron significativamente relacionados con el número total de folículos ( $r = 0.967$ ) (Torres-Rovira *et al.* 2014). También en yeguas, existe correlación positiva entre el conteo de folículos antrales y la concentración de la AMH (Claes *et al.* 2015).

Los resultados del presente estudio coinciden con los trabajos anteriormente mencionados, debido a que el grupo que tiene mayor concentración de AMH fue el que tuvo mayor cantidad de folículos. Cabe recordar que, al sincronizar la nueva onda folicular, estamos teniendo en uno de los ovarios la formación de un cuerpo lúteo, pero éste no afecta a la cantidad de folículos en crecimiento (Del Campo *et al.* 1995).

#### **4.3 Estudio III: Relación entre calidad de ovocitos con grupos de alta y baja concentración de hormona antimülleriana**

Se realizó la aspiración de los folículos entre 3 a 7 mm, según se detalló en el capítulo de materiales y métodos. La tasa de recuperación de ovocitos fue de 35% en el grupo de alta y 33% en el grupo de baja. La clasificación de los ovocitos según sus calidades entre los grupos de alta y baja AMH se menciona en la Tabla 2.

**Tabla 2: Número de ovocitos en grupos de alta y baja concentración de AMH en relación con la calidad**

Calidades	Alta AMH	Baja AMH	
A	12 (27.9%)	1 (2.3%)	
B	10 (23.3%)	5 (11.6%)	
C	6 (14.0%)	6 (14.0%)	
D	1 (2.3%)	2 (4.7%)	
Total	29	14	43

Los valores del Cuadro 2 se trabajaron con la prueba de chi-cuadrado. Al comparar las calidades de ovocitos con los grupos de concentración de AMH (alta y baja) hubo independencia. En cambio, al analizar solo el grupo alta, se encontró dependencia con las calidades de ovocitos ( $p$ -valor = 0.02). Por el contrario, en el grupo de baja, no se encontró dependencia con las calidades de ovocitos ( $p$ -valor = 0.18).

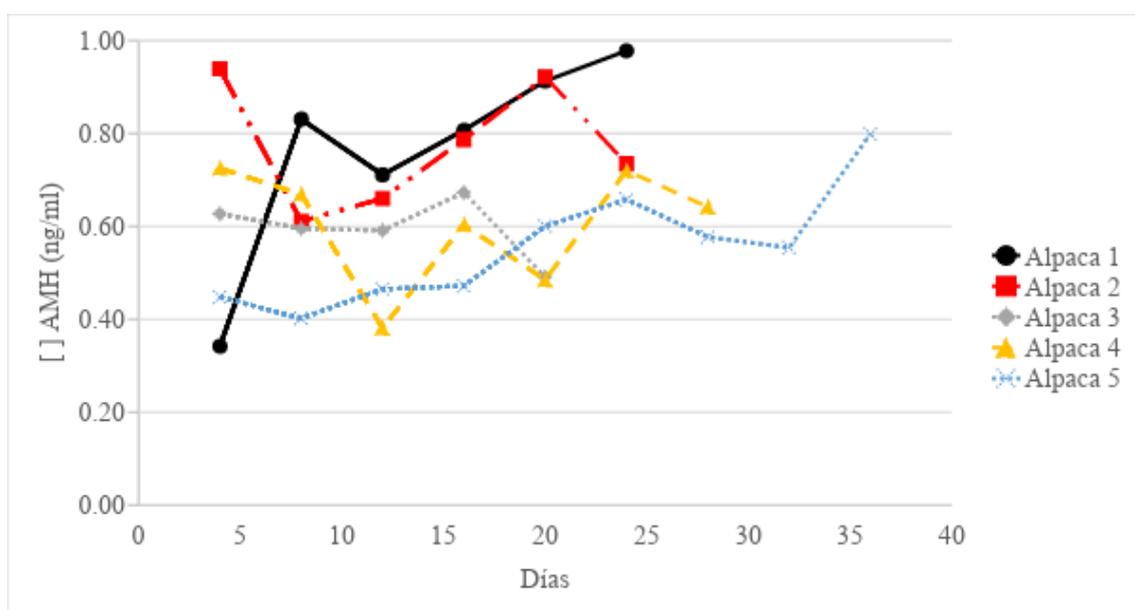
Según estos resultados, podemos inferir que las alpacas que tengan mayor concentración de AMH, también presenten ovocitos de mejor calidad. Algo similar describe Gamarra *et al.* (2015) en vacas, pues encuentra que existe un efecto entre la calidad morfológica de ovocitos y los grupos de concentración de AMH, obteniendo mayor cantidad de ovocitos de grado 1 en alta ( $4.5 \pm 0.4$ ) que en el grupo de baja concentración ( $2.8 \pm 0.5$ ).

En mujeres, los estudios de concentración de AMH con relación a la calidad de ovocitos siguen siendo contradictorios. En algunas investigaciones, la AMH está relacionada con la cantidad y calidad de ovocitos (Al-Azemi *et al.* 2011, Ebner *et al.* 2006). En otra investigación, la relación entre calidad (incremento de la maduración folicular) y AMH se vuelve indirectamente proporcional (Cupisti *et al.* 2007). Por último, en el estudio de Guerif *et al.* (2009) sólo reconocen a la AMH como marcador para la cantidad de ovocitos, más no para la calidad de éstos.

#### 4.4 Estudio IV: Cuantificación de la hormona antimülleriana en la onda folicular

Se considero la onda folicular desde la inducción de ovulación hasta la aparición del siguiente folículo dominante ( $> 7$  mm), teniendo una duración promedio de 29.6 días, siendo la onda más corta de 20 días y la más larga de 36 días en los 5 animales evaluados. Además, los folículos dominantes en 4 animales llegaron a medir más de 12 mm, coincidiendo que el folículo dominante de la alpaca con la duración de onda más corta también fue el que alcanzó menor tamaño (8.5 mm).

La AMH presentó variaciones en la concentración en la onda folicular en todos los animales evaluados, siendo difícil poder separarlo por fases (Figura 9).

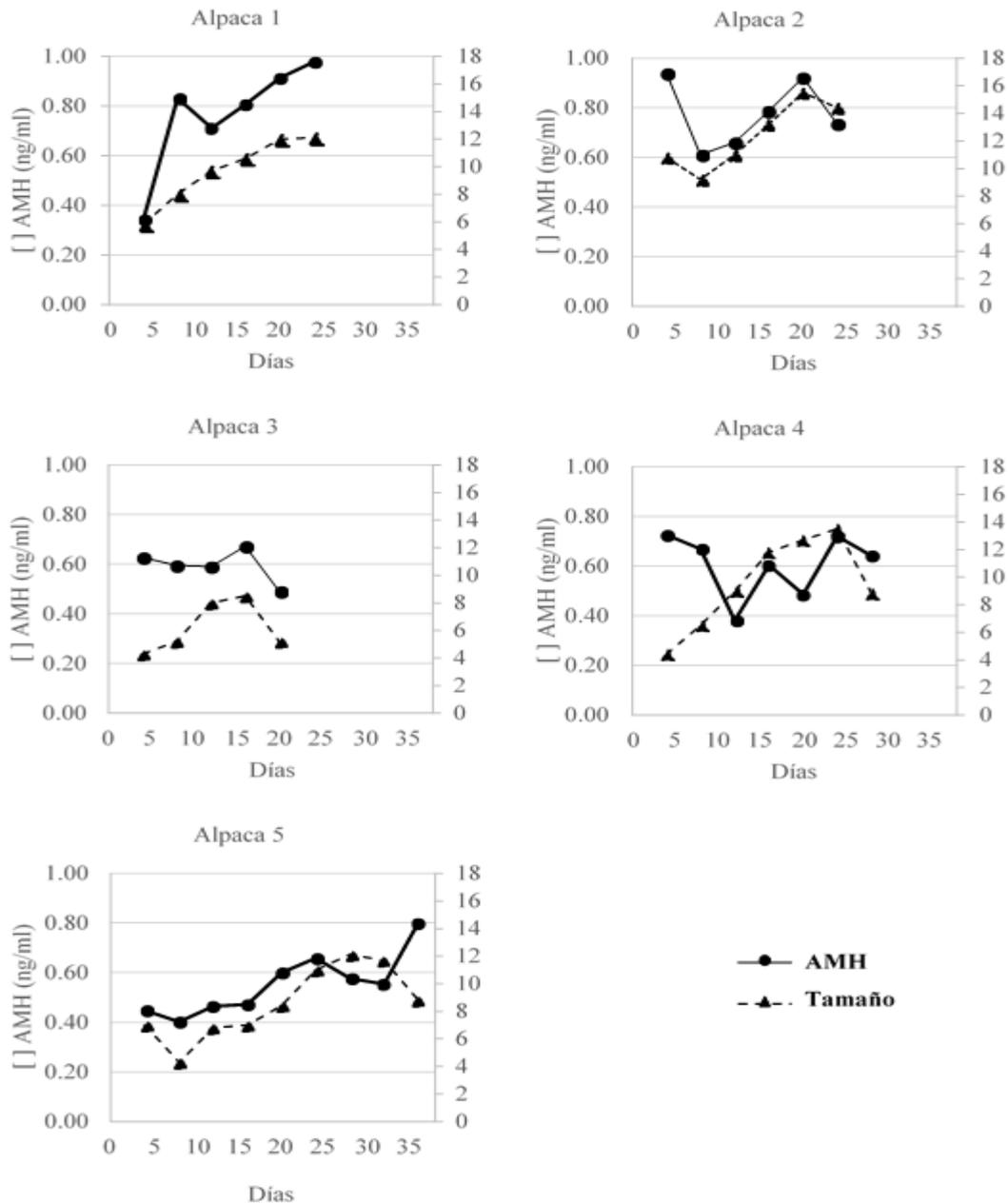


**Figura 9: Perfil hormonal de AMH durante la onda folicular de cinco alpacas**

Además, se correlacionó el tamaño del folículo dominante y la concentración de AMH en el tiempo, encontrando que existe una correlación positiva entre estas dos variables y se repite en cada animal, siendo la correlación general 0.52. (Anexo 7). La Figura 10 muestra las correlaciones por alpaca.

Bravo y Sumar (1989) reportan que el largo de la onda folicular es aproximadamente 12 días, durando la etapa de crecimiento 4 días. Contrariamente, Vaughan *et al.* (2004) obtuvo que la duración del crecimiento folicular pueda ser de 10 días desde que comienza la nueva onda y el largo de toda la onda folicular está asociado con el tamaño máximo

del diámetro del folículo dominante. En el presente estudio, el rango de días en la onda folicular varía desde 20 a 36 días, no concordando con la primera investigación mencionada. Además, la mayoría de los animales alcanzaron un folículo dominante mayor a 12 mm y el animal que solamente llegó a 8 mm fue el que tuvo la onda folicular más corta. Esto concuerda con lo escrito por Vaughan, pensando que el largo de la onda folicular va a estar relacionado con el tamaño del folículo dominante.



**Figura 10: Correlación entre la concentración de AMH con el tamaño del folículo dominante en la onda folicular**

En este estudio, tuvimos la dificultad de poder comparar la estabilidad de la AMH en las fases de la onda folicular, debido a que las muestras de sangre fueron tomadas cada 4 días. Además, cuando se hallaba el folículo dominante (diámetro < 7 mm) no siempre se mantenía en el mismo tamaño (a veces aumentaba o disminuía ciertos mm), siendo difícil para nuestro estudio discernir si seguía en crecimiento o ya estaba en la fase de estática.

En estudios con mujeres, no se encuentra diferencias entre las etapas en ciclos menstruales normales (Hehenkamp *et al.* 2006) y en mujeres infértiles (van Disseldorp *et al.* 2009) para la evaluación de la reserva ovárica. Además, en vacas multíparas clínicamente sanas tampoco se encontraron diferencias entre los días del ciclo estral ni entre las fases del ciclo estral (El-Sheikh Ali *et al.* 2013). Estos resultados no concuerdan con nuestro estudio. Suponemos que, al ser ovuladoras inducidas, las alpacas no van a seguir el mismo patrón que las ovuladoras espontáneas.

Este estudio es el primero en relacionar el tamaño del folículo dominante con la AMH. Aunque es difícil explicar esta tendencia del incremento AMH cuando incrementa el tamaño del folículo dominante, nos hace pensar que, los folículos preantrales y antrales pequeños que no llegaron a ser el folículo dominante, no se llegan a atresiar y sólo detienen su crecimiento, pero siguen secretando AMH, acompañando al folículo dominante hasta que éste ovule o regrese.

## V. CONCLUSIONES

1. Las alpacas que están en etapa reproductiva presentan alta variabilidad en la concentración de la AMH.
2. La cantidad promedio de folículos por alpaca en el grupo de alta concentración de AMH es mayor que en el grupo de baja ( $p < 0.05$ ).
3. Existe una posible dependencia entre la concentración de AMH y calidad de los ovocitos del grupo de alta, encontrándose un 41.4% de ovocitos de calidad A en el grupo de alta frente a sólo un 7.1% de ovocitos de calidad A en el grupo de baja concentración de AMH.
4. Se presume que, en la onda folicular en alpacas, los folículos que no llegan a ser dominantes sólo detienen su crecimiento, pero siguen secretando AMH hasta que el folículo dominante ovule o se atresie.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Para los protocolos de superovulación, sería recomendable trabajar con los animales que tengan mayor concentración de AMH.
- Si se quisiera evaluar la concentración de AMH en alpacas, el momento más adecuado para tomar la muestra de sangre sería en el crecimiento de la onda folicular.
- Es recomendable realizar un estudio más profundo en la evaluación de la estabilidad de la AMH en la onda folicular en alpacas para poder predecir el comportamiento exacto de esta hormona.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, G; Griffin, PG; Ginther, OJ. 1989. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biology of Reproduction* 551-558.

Adams, G; Ratto, M; Huanca, W; Singh, J. 2005. Ovulation-Inducing Factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol Reprod.* 73:452–457.

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

Adams, GP; Ratto, MH. 2001. Reproductive biotechnology in south American camelids. *Rev. Inv. Vet. Perú. Supl. 1* :134- 141.

Adams, GP; Ratto, MH; Collins, CW; Bergfelt, DR. 2009. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology* 71(1):166–175.

Al-Azemi, M; Killick, SR; Duffy, S; Pye, C; Refaat, B; Hill, N; Ledger, W. 2011. Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction. *Human Reproduction* 26(2):414–422.

Apaza, N; Sapaná, R; Huanca, T; Huanca, W. 2001. Inseminación Artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 1:435-438.

Arribas, J; Rodríguez N; Esteve B; Beltrán, M. 2001. Anestesia local y locorreional en cirugía menor. *SEMERGEN* 27(9):471–481.

Baarends, WM; Uilenbroek, JT; Kramer, P; Hoogerbrugge, JW; van Leuwen, EC; Themmen, AP; Grootegoed, LA. 1995. Anti-mullerian hormone and anti- mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonado- tropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 136:4951–4962.

Batista, EOS; Macedo, GG; Sala, RV; Ortolan, MDDV; Sá Filho, MF; Del Valle, TA; Jesus, EF; Lpoes, RNVR; Rennó, FP; Baruselli, PS. 2014. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in bos indicus (nelore) and bos taurus (holstein) heifers. *Reproduction in Domestic Animals* 49(3):448–452.

Bravo, PW; Flore, U; Garnica, J; Ordonez, C. 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47:619–626.

Bravo, PW; Fowler, ME; Stabenfeldt, GH; Lasley, B. 1990. Endocrine responses in the lama to copulation. *Theriogenology* 33(4):891-899.

Bravo, PW; Stabenfeldt, GH; Lasley, BL; Fowler, ME. 1991. The effect of ovarian follicular size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids. *Biol. Reprod.* 45:553–559.

Bravo, W; Jhonson, L. 1994. Reproductive physiology of the male camelid. *In* Llama medicine. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*. Ed. LW Johnson. Philadelphia. Saunders Company. p. 259–264.

Bravo, W; Sumar, J. 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal Reproduction Science* 21:271–281.

Bravo, WM. 1988. Hormonas folículo estimulante y luteinizante en llamas. Fowler, ME; Lasley, B; Stabenfeldt, GH. Programa y Resúmenes de trabajos. Convención Internacional de Especialistas en Camélidos (6, 1988, Bolivia). Oruro, Bolivia.

Bravo, WM; Sidkmore, JÁ; Zhao, X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen camelids. *Animal Reproduction Science* 62:173-193.

Bravo, WP. 2002. The reproductive process of South American camelids. Salt Lake City, Seagull Printing.

Brown, B. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science* 58:169-195.

Budzik, GP; Swann, DA; Hayashi, A; Donahoe, PK. 1980. Enhanced purification of Mullerian Inhibiting substance by Lectin Affinity chromatography. *Cell* 21:909-915.

Burns, DS; Jimenez-Krassel, F; Ireland, JL; Knight, PG; Ireland, JJ. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum Follicle-Stimulating Hormone concentrations. *Biology of Reproduction* 73(1):54-62.

Bustanza, VC. 2001. La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno, Oficina de Recursos del Aprendizaje, Universidad Nacional del Altiplano. 343 p.

Cabrera, R; Lopez, A; Maiztegui, J; Marín, M. 1996. Fistulación y canulación permanente del compartamiento 1 (rumen) en alpacas (*Lama pacos*). *Avances en Medicina Veterinaria* 11(2).

Calderon, W; Sumar, J; Franco, E. 1968. Avances de la inseminación artificial de las alpacas (*Lama pacos*). *Revista de investigaciones veterinarias del Perú* 2:19-35.

Canahua Murillo, A; Canahua, PR. 2015. Camélidos sudamericanos: revaloración y pautas para el desarrollo sostenible. *Agro Enfoque* 29:18-24.

Capece, E; Pelanda, M; Dicugno, M; De Sampaio, EG; Buongiorno, G; Corazza, N; Ruibal, G. 2016. La hormona antimülleriana como marcador de función ovárica. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 53:106-113.

Care, RL; Mattaliano, RJ; Hession, C; Tizard, R; Farber, NM; Cheung, A; Ninfa, EG; Frey, AZ; Gash, DJ; Chow, EP; Fisher, RA; Bertonis, JM; Torres, G; Wallner, BP; Ramachandran, KL; Ragin, RC; Manganaro, TF; MacLaughlin, DT; Donahoe, PK. 1986.

Isolation of the bovine and human genes for Müllerian Inhibiting substance and expresión of the human gene in animal cells. *Cell* 45:685-698.

Ccama Arela, RH. 2017. Anestesia epidural lumbosacra, con la combinación de Lidocaina - Fentanilo - Xilacina en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis para optar título profesional. Puno, Perú. Universidad Nacional del Altiplano. 80 p.

Céliz, RH. 2017. Determinación de la reserva ovárica en alpacas mediante la concentración de hormona AMH en el plasma sanguíneo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 71 p.

Chaves, MG; 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* 69:37-46.

Chen, BX; Yuen, ZX; Pan, CW. 1984. Factors inducing ovulation in the bactrian camel.

Claes, A; Ball, BA; Scoggin, KE; Esteller-Vico, A; Kalmar, JJ; Conley, AJ; Squires, EL; Troedsson, MHT. 2015. The interrelationship between anti-Müllerian hormone, ovarian follicular populations and age in mares. *Equine Veterinary Journal* 47(5): 537–541.

Claes, ANJ; Ball, BA. 2016. Biological functions and clinical applications of Anti-Müllerian hormone in stallions and mares. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* 32(3):451–464.

Cupisti, S; Dittrich, R; Mueller, A; Strick, R; Stiegler, E; Binder, H; Beckmann, MW; Strissel, P. 2007. Correlations between anti-müllerian hormona, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *European Journal of Medical Research* 12:604–608.

de Loos, F; van Maurik, P; van Beneden, T; Kruip, TA. 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular reproduction and development* 31(3):208–214.

de Loos, F; van Vliet, C; van Maurik, P; Kruip, TAM. 1989. Morphology of immature

bovine oocytes. *Gamete Research* 24(2):197–204.

Del Campo, MR; Del Campo, CH; Adams, GP; Mapletoft, RJ. 1995. The application of new reproductive technologies to South American camelids. *Theriogenology* 43(1):21–30.

Depmann, M; van Disseldorp, J; Broer, SL; Eijkemans, MJC; Laven, JSE; Visser, JA; de Rijke, YB; Mol, BW; Broekmans, FJM. 2016. Fluctuations in anti-Müllerian hormone levels throughout the menstrual cycle parallel fluctuations in the antral follicle count: a cohort study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 95:820–828.

DESCO (Centro de estudios y promoción del desarrollo, Perú) 2017. Inseminación artificial de alpacas en un contexto de crianza campesina. 119 p.

Durlinger, ALL; Kramer, P; Karels, B; de Jong, F; Uilenbroek, JTT; Grootegoed, JA, Themmen, APN. 1999. Control of primordial follicle recruitment by Anti-Müllerian hormone in mouse ovary. *Endocrinology* 140(12):5789-5796.

Ebner, T; Sommergruber, M; Moser, M; Shebl, O; Schreier-Lechner, E; Tews, G. 2006. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Human Reproduction* 21(8):2022–2026.

El-Sheikh Ali, H; Kitahara, G; Nibe, K; Yamaguchi, R; Horii, Y; Zaabel, S; Osawa, T. 2013. Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. *Theriogenology* 80(8):940–949.

England, BG; Foote, WC; Cardozo, AG; Matthews, DH; Riera, S. 1971. Oestrous and mating behaviour in the llama (*Llama glama*). *Anim Behav* 19(4):722-726.

Espezúa, O; Chipayo, Y; Olazabal, J. 2015. Anestesia total intra venosa de la combinación xilacina , ketamina y fentanilo para canulación del primer compartimento en alpacas. *Revista de Investigaciones Altoandinas* 17(1):41–46.

Fernández-Baca, S. 1970. Luteal function and the nature of reproductive failures in the alpaca. Ph.D. Thesis. New York. Cornell University.

Fernández-Baca, S; Hansel, W; Novoa, C. 1970. Embryonic mortality in the alpaca. Biol. Reprod. 3:243–251.

Fernández-Baca, S; Novoa, C. 1968. Conducta sexual de la alpaca (*Lama pacos*) en empadre a campo. Memoria. In Asociación Latinoamericana en Producción Animal. p. 7-20.

Fernández-Baca, S; Sumar, J; Novoa, C. 1972. Comportamiento de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. Memoria. In Asociación Latinoamericana de Producción Animal 7:7-18.

Fowler, ME. 1989. Medicine and surgery of South American camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco. Ames, Iowa State University Press. 549 p.

Franco, E; Sumar, J; Varela, M. 1981. Eyaculación en la alpaca (*Lama pacos*). Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos (4, 1981, Chile). Punta Arenas, Corporación Nacional Forestal, Instituto de la Patagonia.

Fried, G; Remaeus, K; Harlin, J; Krog, E; Csemiczky, G; Aanesen, A; Tally, M. 2003. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/ IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 20:167-176.

Gamarra, G; Ponsart, C; Lacaze, S; Le Guienne, B; Deloche, MC; Monniaux, D; Ponter, AA. 2014. Short term dietary propylene glycol supplementation affects circulating metabolic hormones, progesterone concentrations and follicular growth in dairy heifers. Livestock Science 162(1):240–251.

Gamarra, G; Ponsart, C; Lacaze, S; Le Guienne, B; Humblot, P; Deloche, MC; Monniaux, D; Ponter, AA. 2015. Dietary propylene glycol and in vitro embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles. Reproduction, Fertility

and Development 27(8):1249–1261.

García, W; Alarcón, V; Bravo, PW. 2017. Inseminación artificial de alpacas con semen refrigerado y con inclusión de dos tipos de yema de huevo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 28(2):337-344.

Gigli, I; Russo, A; Agüero, A. 2006. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *Investigación veterinaria* 1(8):183-203.

Gomendio, M; Roldán, E; Garde, J; Espeso, G. 2006. El papel de las biotecnologías reproductivas en la conservación animal. *Ecosistemas* 15(2):50–57.

Gómez, F; Chávez, A; Casas, E; Serrano, E. 2003. Determinación de la seroprevalencia de toxoplasmosis en alpacas y llamas en la Estación Experimental INIA - Puno. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 14(1):49–53.

Gonzales, M; Huanca, T; Cárdenas, M. 2011. Evaluación de la fertilidad en alpacas inseminadas con semen refrigerado a diferentes tiempos post inducción de ovulación. *Spermova* 1(1):102–103.

Grimek, HJ; Gorski, J; Wentworth, BC. 1979. Purification and characterization of bovine Follicle-Stimulating hormone: comparison with ovine follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 104:140-147.

Guerif, F; Lemseffer, M; Couet, ML; Gervereau, O; Ract, V; Royère, D. 2009. L'hormone antimüllérienne sérique n'est pas prédictive de la qualité ovocytaire en fécondation in vitro. *Annales d'Endocrinologie* 70:e29–e34.

Hafez, E; Hafez, B. 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7 ed. México, McGraw-Hill Interamericana. 519 p.

Hehenkamp, WJ; Looman, CW; Themmen, AP; de Jong, FH; Te Velde, ER; Broekmans, FJ. 2006. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(10):4057-4063.

Hehenkamp, WJ; Looman, CW; Themmen, AP; de Jong, FH; Te Velde, ER; Broekmans, FJ. 2006. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(10):4057-4063.

Huanca, T. 2008. Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG) en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis doctoral. Santiago de Compostela, España. Universidad de Santiago de Compostela. 137 p.

Huanca, W. 2004. Aplicación de biotecnologías en el mejoramiento genético de alpacas y llamas fase I: Desarrollo y evaluación de un protocolo de transferencia de embriones. *Boletín del Consejo Superior de Investigaciones* 55:8-12.

Huanca, W. 2012. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos como alternativas para la mejora genética. *In XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal y VI Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito*. (16 y 6, 2012, Maracaibo, Venezuela). Ponencia. Maracaibo. Venezuela. p. 1-6.

Huanca, W; Cardenas, O; Olazabal, C; Ratto, M; Adams GP. 2001. Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 1:462-463.

Huanca, W; Cordero, A; Huanca, T; Adams, G. 2007. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Arch Latinoam Prod Anim* 15:195-201.

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática, Perú). 2012. Resultados definitivos: IV Censo Nacional Agropecuario.

Ireland, JJ; Ward, F; Jimenez-Krassel, F; Ireland, JL; Smith, GW; Lonergan, P; Evans, AC. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction* 22:1687-1695.

Ireland, JLH; Scheetz, D; Jimenez-Krassel, F; Themmen, APN; Ward, F; Lonergan, P; Smith, GW; Perez, GI; Evans, ACO; Ireland, JJ. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction* 79(6):1219-1225.

IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). 2008. Una perspectiva mundial sobre el valor económico total del pastoralismo. Informe de síntesis global basado en seis estudios del país. 27 p.

Josso, N; Picard, JY; Rey, R; di Clemente, N. 2006. Testicular anti-Müllerian hormone: History, genetics, regulation and clinical application. *Pediatr Endocrinol Rev.* 3:347–358.

Kitahara, G; Nambo, Y; El-Sheikh Ali, H; Kajisa, M; Tani, M; Nibe, K; Kamimura, S. 2012. Anti-Müllerian hormone profiles as a novel biomarker to diagnose granulosa-theca cell tumors in cattle. *Journal of Reproduction and Development* 58(1):98–104.

Kumar, TR; Palapattu, G; Wang, P; Woodruff, TK; Boime, I; Byrne, MC; Matzuk, MM. 1999. Transgenic models to study gonadotropin function: the role of follicle-stimulating hormone in gonadal growth and tumorigenesis. *Molecular Endocrinology* 13:851– 865.

Kwee, J; Schats, R; McDonnell, J; Lambalk, CB; Schoemaker, J. 2004. Intercycle variability of ovarian reserve tests: Results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 19:590-595.

Lahoz, B; Alabart, JL; Cocero, MJ; Monniaux, D; Echegoyen, E; Sánchez, P; Folch, J. 2014. Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: an endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology* 81(2):347-357.

Leyva, V; Sumar, J; Franco, E. 1977. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Resumen. Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. (1,1977).

Lin, H; Walz, P. 2014. Farm Animal Anesthesia: cattle, small ruminants, camelids and

pigs. John Wiley & Sons, Inc. 256 p.

Lonegro, N; Napoli, N; Pesce, R; Chacón, C. 2016, Recuento de folículos antrales como predictor de la respuesta ovárica. *Revista Argentina de Radiología* 80(40):252-257.

López, H; Sartori, R; Wiltbank, MC. 2005. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Biology Reproduction* 72:788-795.

Malhi, PS; Adams, GP; Singh, J. 2005. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology Reproduction* 73:45-53.

Mendoza, G. 2007. Comparación anatómica entre dos técnicas quirúrgicas de laparotomía en camélidos sudamericanos. Echevarria, L; Evaristo, R. Memoria. Reunión científica de la Asociación Peruana de Producción Animal, Reunión científica Asociación Latinoamericana de Producción Animal (Cusco, Perú). p. 3–5.

Ministerio de Agricultura y Riego, Perú. 2007. Perú: Compendio estadístico agrario 1994-2005. p. 1319-1339.

Miragaya, MH; Chaves, MG; Agüero, A. 2006. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research* 61(2–3):299–310.

Montalvo, C; Cevallos, E; Copaira, M. 1979. Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. Res. Proyectos de Investigación, Período 1975–1979. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p. 37.

Moor, RM; Kruip, AM; Green, D. 1984: Intra ovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology* 22:103-116.

Moustakas, A; Heldin, CH. 2009. The regulation of TGF $\beta$  signal transduction. *Development* 136:3699–3714.

Munsterberg, A; Lovell-Badge, R. 1991. Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113:613–624.

Novoa C. 1991. Fisiología de la reproducción de la hembra. In *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. Ed. S Fernández-Baca. Santiago de Chile. p. 91-110.

Novoa, C. 1970. Reproduction in Camelidae: a review. *Journal of Reproduction Fertility* 22:3–20.

ONUDI (Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial). 2010. Estado de situación del sector textil camélidos en el Perú. 47 p.

Pacheco, J; Vélez, V; Pezo, D. 2016. Evaluación de la eficiencia de la transferencia de embriones interespecie entre alpacas y llamas obtenidos por ovulación simple. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27(1):64–69.

Padmanabhan, V; Karsch, FJ; Lee, JS. 2002. Hypothalamic, pituitary and gonadal regulation of FSH. *Reproduction (Cambridge, England)* 59:67–82.

Ratto, MH; Silva, ME; Huanca, W; Huanca, T; Adams, GB. 2013. Induction of superovulation in South American camelids. *Animal Reproduction Science* 136:164-169.

Revelli, A; Delle Piane, L; Casano, S; Molinari, E; Massobrio, M; Rinaudo, P. 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7:40.

Reyes, VSV. 2010. Evaluación de la reserva ovárica. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción* 2(4):89-95.

Rico, C; Drouilhet, L; Salvetti, P; Dalbiès-Tran, R; Jarrier, P; Touzé, J-L; Pillet, E; Ponsart, C; Fabre, S; Monniaux, D. 2012. Determination of anti-Müllerian hormone

concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm. *Reproduction, Fertility and Development* 24(7):932-944.

Ríos, M. 1989. Presencia de un factor de inducción de ovulación en el semen de alpaca y toro. Tesis de Médico Veterinario. Lima, Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 39 p.

Robertson, DM. 2012. Inhibins and activins in blood: predictors of female reproductive health? *Mol Cell Endocrinol.* 359(1-2):78-84.

Ruiz, J. 2013. Situación actual de la producción de camélidos sudamericanos en latinoamérica. *In VIII Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos.* (8, 2013, Campo Grande, Brasil) Palestra. Campo Grande. Brasil. p. 88-95.

Ruiz, J. 2015. Estado de la producción de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos. *Spermova* 5(2):264-269.

San Martín, M; Copaira, M; Zuniga, J; Rodriguez, R; Bustinza, G; Acosta, L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *Journal of Reproduction Fertility* 16(3):395-399.

Sato, A; Montoya, L. 1990. Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*). *Rev. Camélidos sudamericanos* 7:13.

Sato, A; Nuñez, Q; Valencia, R. 1988. Estudio anatómico de las arterias del útero de la alpaca (*Lama pacos*). *Rev. Camelid. Sudamer.* 6.

Scheffer, GJ; Broekmans, FJM; Looman, CWN; Blankenstein, M; Fauser, BC; teJong, FH; teVelde, ER.2003. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod* 18:700-706.

Silva-Santos, KC; Marinho, LSR; Santos, GMG; Machado, FZ; Gonzalez, SM; Lisboa, LA; Seneda, MM. 2013. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Animal Reproduction Science* 10:180–186.

Silverman, L; Gitelman, S. 1996. Immunoreactive inhibin, müllerian inhibitory substance, and activin as biochemical markers for juvenile granulosa cell tumors. *The journal of pediatrics* 129(6):918-921.

Smith, CL; Peter, AT; Pugh, DG. 1994. Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology* 41:573-592.

Sumar, J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. Masters Thesis. Uppsala. Swedish University of Agricultural Sciences. 103 p.

Sumar, J. 1985. Reproductive physiology in South American camelids. En: *Genetics of Reproduction in Sheep*. Eds R Land; S Robinson. London. Butterworths. p 81–95.

Sumar, J. 1996. Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science* 42:405-415.

Sumar, J. 2000. Llamas and alpacas. *In Reproduction in farm animals*. 7 ed. Eds. ESE Hafez; B Hafez. México. McGraw-Hill. p. 224-242.

Sumar, J; Franco, E. 1974. Informe Final IVITA-La Raya. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. p. 35.

Sumar, JB. 2013. Embryo transfer in domestic South American camelids. *Animal Reproduction Science* 136(3):170-177.

Tibary, A. 2001. Fertilization, embryo and fetal development in camelids. *Proceedings. Annual Conference of the Society for Theriogenology (2001, Canada)*. Vancouver. 387-396 p.

Torres, D. 2007. Entre el pasado y la innovación. La fibra de alpaca en el sur peruano. *Perú Hoy* 12:1–27.

Torres-Rovira, L; Gonzalez-Bulnes, A; Succu, S; Spezzigu, A; Manca, ME; Leoni, GG; Sanna, Marina; Pirino, S; Gallus, M; Naitana, S; Berlinguer, F. 2014. Predictive value

of antral follicle count and anti-Müllerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. *Reproduction, Fertility and Development* 26(8):1094–1106.

van Disseldorp, J; Lambalk, CB; Kwee, J; Looman, CW; Eijkemans, MJ; Fauser, BC; Broekmans, FJ. 2009. Comparison of inter-and intra-cycle variability of anti- Müllerian hormone and antral follicle counts. *Human Reproduction* 25(1):221-227.

Vaughan, JL. 2001. Control of ovarian follicular growth in the alpaca (*Lama pacos*). Ph.D. Thesis. Central Queensland University.

Vaughan, JL; Macmillan, KL; Anderson, GA; D’Occhio, MJ. 2003. Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. *Aust. Vet. J.* 81:64–68.

Vaughan, JL; Macmillan, KL; D’Occhio, MJ. 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science* 80:353-361.

Vivanco, W; Ponce, D; Miguel, M; Youngs, C; Huamán, E; León, S; Asparrin, M. 2014. Repetibilidad de la respuesta ovárica y de la producción embrionaria en alpacas huacaya superovuladas. *Spermova* 4(1):77-79.

Welt, CK. 2002. The physiology and pathophysiology of inhibin, activin and follistatin in female reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 14(3):317–323.

## **VIII. ANEXOS**

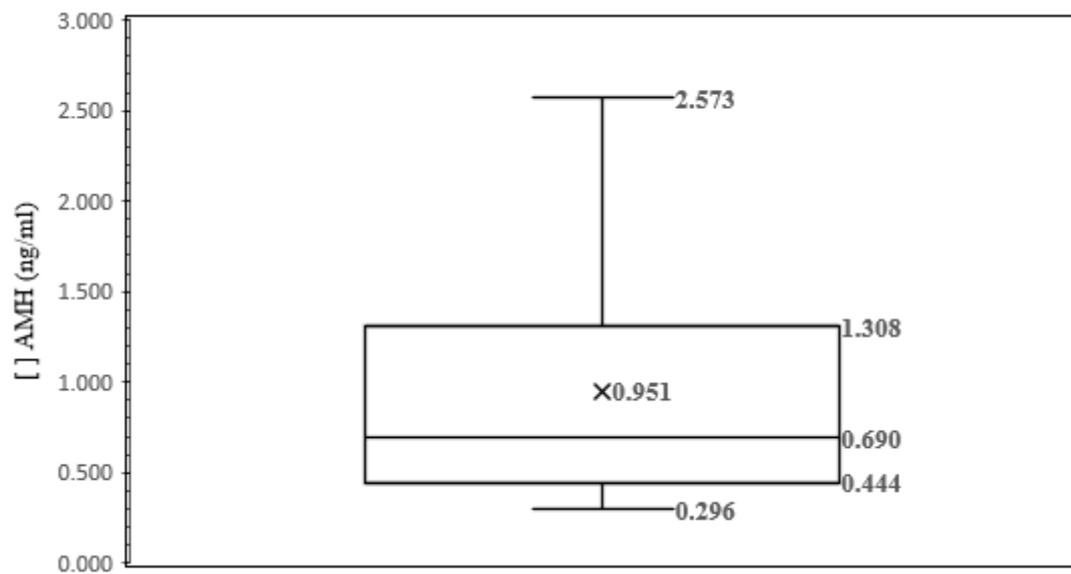
## ANEXO 1: Materiales, reactivos, fármacos y equipos

	Materiales		Reactivos y fármacos	Equipos
Sogas	Micropipeta multicanal	Hoja de afeitarse	Kit AMH ELISA	Centrífuga
Collares	Micropipetas de 10, 100 y 1000	Hoja de bisturí N° 20	Alcohol de 96°	Congeladora
Marcadores	Puntas para micropipetas	Jeringas totalmente de plástico de 5 ml	Acetato de buserelina	Lectora de ELISA
Capucha para alpacas	Reservorios de plástico	Placas de cuatro pocillos	Ketamina de uso veterinario	Estereoscópio
Guantes de examinación	Papel Parafilm	Placas de Petri de 30 mm x 15 mm	Xilacina de uso veterinario	Ecógrafo
Guantes de palpación	Probeta graduada	Suturas absorbibles y no absorbibles	Atropina de uso veterinario	Balanza digital
Gel ecográfico	Campos quirúrgicos estériles descartables	Apósitos y torundas estériles	Penicilina-estreptomina de uso veterinario	Agitador magnético
Jeringas de 1, 3, 5 y 10 ml	Instrumental de cirugía	Gasa estéril	Diclofenaco sódico de uso veterinario	Purificador de agua
Agujas 21G	Guantes quirúrgicos	Microtubos de 2 ml	Lidocaína de uso veterinario	Calibrador de Vernier
Algodón	Mandiles quirúrgicos descartables	Caja de poliestireno expandido	Medio para colección de embriones	Frontoluz
Tubo con EDTA K2	Mascarilla descartable	Gel refrigerante	Acetato de clorhexidina al 4%	Esterilizador de calor seco
Pipetas Pasteur descartables	Gorro descartable		Alcohol yodado  Hielo Seco Curabichera	Calentador de placas

## ANEXO 2: Registro de concentración promedio de AMH

N	Alpaca	Identificación	Edad	Concentración AMH Promedio
1	2	11S26D	5	0.644
2	3	11S102E	6	1.252
3	6	11S91E	6	0.526
4	8	13S373E	4	0.529
5	9	10S258F	7	0.386
6	10	13S57D	3	1.326
7	11	13S94E	4	0.51
8	12	13S303E	4	0.956
9	14	13S472F	4	0.559
10	15	13S03D	3	1.611
11	16	10S50E	7	0.529
12	17	12S60D	4	0.49
13	18	13S505F	4	0.421
14	21	12S384F	5	1.605
15	22	10S16E	7	0.377
16	23	11S302E	6	0.404
17	24	11S317F	6	0.553
18	25	13S285E	4	0.76
19	28	11S110E	6	0.405
20	30	13S23D	3	0.572
21	31	10S211E	7	2.051
22	32	10S98E	7	1.863
23	36	11S03D	5	1.715
24	37	11S338F	6	1.23
25	38	10S241E	7	0.785
26	39	12S69E	5	2.573
27	41	13S298E	4	0.296
28	42	11S43D	5	1.345
29	43	12S356E	5	2.555
30	44	11S277E	6	0.834
31	45	11S268E	6	0.961
32	46	12S123E	5	0.339
33	14B	11S359F	5	0.342
34	2A	11S295E	5	0.735
35	4A	10S106E	6	0.429
36	6A	12S240E	5	2.135
37	7A	11S142E	5	1.164
38	8A	10S80E	6	0.359

### ANEXO 3: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de AMH en alpacas



#### ANEXO 4: Concentración de AMH según edades en las alpacas

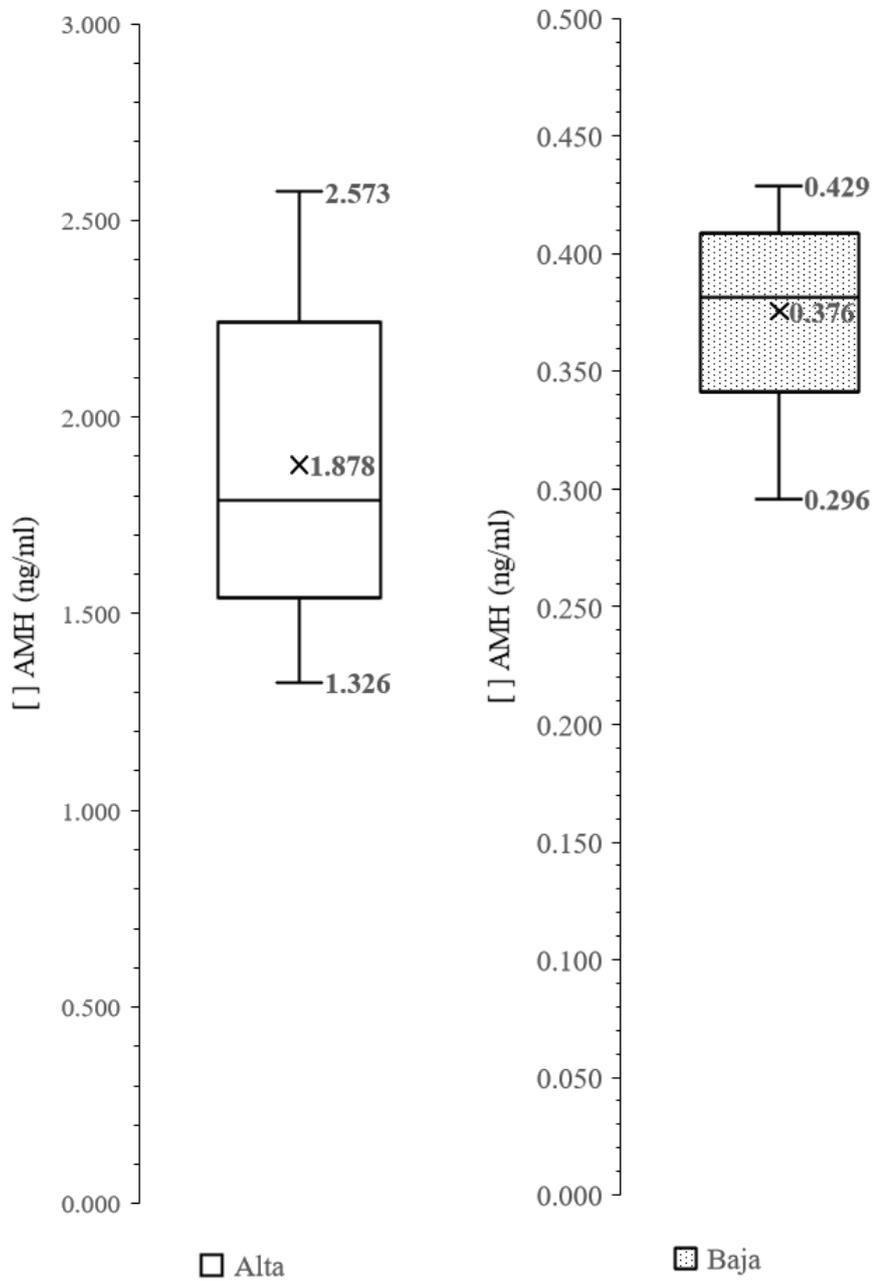
Años	Alpacas (n)	Prom AMH $\pm$ ES
3	3	1.169 $\pm$ 0.341 <sup>a,b</sup>
4	8	0.565 $\pm$ 0.209 <sup>a</sup>
5	11	1.377 $\pm$ 0.178 <sup>b</sup>
6	10	0.695 $\pm$ 0.187 <sup>a,b</sup>
7	6	0.998 $\pm$ 0.241 <sup>a,b</sup>

n: Número de alpacas

Prom AMH  $\pm$  ES: Promedio de la concentración de AMH  $\pm$  error estándar

a,b: Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre columnas

**ANEXO 5: Diagrama de cajas y bigotes para la comparación entre los grupos de alta y baja concentración de AMH**



**ANEXO 6: Comparación entre grupos de alta y baja concentración de AMH en relación con el porcentaje de folículos en los grupos por tamaños**

Tamaño de folículos	Alta AMH		Baja AMH	
	Folículos (n)	Folículos (%) $\pm$ ES	Folículos (n)	Folículos (%) $\pm$ ES
< 3 mm	37	31.28 $\pm$ 11.72 <sup>a</sup>	32	47.57 $\pm$ 10.85 <sup>a</sup>
3 – 7 mm	82	67.49 $\pm$ 13.93 <sup>a</sup>	42	50.82 $\pm$ 12.9 <sup>a</sup>
> 7 mm	4	4.11 $\pm$ 3.36 <sup>a</sup>	7	7.63 $\pm$ 3.11 <sup>a</sup>
Total	123		81	

n: Número de folículos

Folículos (%)  $\pm$  ES: Porcentaje de folículos  $\pm$  errores estándar

a: Letras iguales no indican diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre columnas

**ANEXO 7: Asociación de concentración de AMH y tamaño del folículo durante la onda folicular**

