



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y
DE LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EFECTO DEL PLASMA SEMINAL DE LLAMA
(*Lama glama*), SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN Y
FORMACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS EN
VACAS**

AUTOR: VEGA CHIMARRO DIEGO FERNANDO

DIRECTOR: DR. ULLOA LEAL CESAR, PhD

SANGOLQUÍ

2018



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "*EFECTO DEL PLASMA SEMINAL DE LLAMA (Lama glama), SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN Y FORMACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS EN VACAS*" realizado por el señor *DIEGO FERNANDO VEGA CHIMARRO*, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto, me permito acreditarlo y autorizar al señor *DIEGO FERNANDO VEGA CHIMARRO* para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 07 de febrero de 2018

Dr. CÉSAR ULLOA LEAL

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **DIEGO FERNANDO VEGA CHIMARRO**, con cédula de identidad N° 1500682636, declaro que este trabajo de titulación “**EFECTO DEL PLASMA SEMINAL DE LLAMA (*Lama glama*), SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN Y FORMACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS EN VACAS**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 07 de febrero de 2018

DIEGO FERNANDO VEGA CHIMARRO

C.C 1500682636



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, ***DIEGO FERNANDO VEGA CHIMARRO***, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**EFECTO DEL PLASMA SEMINAL DE LLAMA (Lama glama), SOBRE LA TASA DE OVULACIÓN Y FORMACIÓN DE CUERPOS LÚTEOS ACCESORIOS EN VACA**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 07 de febrero de 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Diego', is written above a horizontal dashed line.

DIEGO FERNANDO VEGA CHIMARRO

C.C 1500682636

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico a mis padres Alfredo y Carmen, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mis hermanos Magali, Carlos y Esteban que más que hermanos son mis verdaderos amigos, quienes sin esperar nada cambio compartieron sus alegrías, tristezas y a todas aquellas personas que durante estos años estuvieron a mi lado apoyándome.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento especial a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-IASA I, la cual me abrió sus puertas para estudiar mi Carrera, así como también a mis profesores por brindarme sus conocimientos y apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco también a mi Director de Tesis Dr. César Ulloa por su gran ayuda y comprensión en el desarrollo de la investigación, ya que compartió sus conocimientos de manera desinteresada.

A mis amigos y compañeros de estudio que siempre estuvieron a mi lado en las buenas y malas apoyándome.

ÍNDICE DE CONTENIDO**CARÁTULA**

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
SUMMARY	xiii

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Antecedentes	2
1.3 Justificación.....	4
1.4 Objetivos	5
1.4.1 Objetivo general	5
1.4.2 Objetivos específicos	5
1.5 Hipótesis.....	5

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO	6
2.1 Introducción	6
2.2 Fisiología del ciclo estral de la vaca	6
2.3 Fases del ciclo estral bovino	6

2.3.1	Fase folicular o regresión luteal	6
2.3.2	Fase luteal.....	7
2.4	Dinámica folicular del ciclo estral de la vaca	8
2.5	Ondas foliculares.....	9
2.6	Mecanismo de ovulación en las especies mamíferas	10
2.7	Mecanismo de ovulación en ovuladores inducidos.....	11
2.8	Factor inductor de la ovulación (OIF).....	11

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOLOGÍA		12
3.1	Ubicación del lugar de investigación	12
3.1.1	Ubicación política	12
3.1.2	Ubicación geográfica	12
3.1.3	Ubicación ecológica	12
3.2	Materiales y métodos	12
3.2.1	Colección de PSSL	12
3.2.2	Animales y tratamientos.....	13
3.2.3	Diseño Experimental.....	15
3.2.4	Variables a medir	16
3.2.5	Métodos específicos de manejo del experimento.....	16

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES		18
4.1	Concentración de proteínas totales en el PSSL.....	18
4.2	Diámetro del folículo preovulatorio.....	19
4.3	Aparición y diámetro del folículo dominante en fase luteal	20
4.4	Tasa de ovulación en fase luteal	21
4.5	Crecimiento del CLP post inseminación.....	22
4.6	Ubicación del CLA	23
4.7	Crecimiento del CLA post inseminación	24

4.8	Crecimiento del CLP Y CLA post inseminación.....	24
4.9	Tasa de preñez a los 45 días.....	26
4.10	Discusión.....	27

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		32
5.1	Conclusiones	32
5.2	Recomendaciones.....	32
5.3	Bibliografía	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Promedio \pm EE del volumen de semen, concentración de proteína y β -NGF presente en el plasma seminal	18
Tabla 2 Promedio \pm EE del día de aparición de un folículo dominante en fase luteal post inseminación.....	20
Tabla 3 Tasa de ovulación en fase luteal en vacas como respuesta a la administración intramuscular de PSSL, GnRH y PBS	22
Tabla 4 Posición del cuerpo lúteo accesorio con respecto al cuerpo lúteo primario.....	23
Tabla 5 Tasa de crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo primario durante cinco días	26
Tabla 6 Tasa de crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo accesorio durante cinco días	26
Tabla 7 Tasa de preñez a los 45 días post inseminación.....	27
Tabla 8 Tasa de preñez con formación de cuerpo lúteo accesorio a los 45 días post inseminación	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Fases del ciclo estral	8
Figura 2	Dinámica Folicular durante un Ciclo Estral	9
Figura 3	Grados de condición corporal	14
Figura 4	Diagrama de protocolo de sincronización de celo	14
Figura 5	Diagrama de la aplicación de los tratamientos	15
Figura 6	Diámetro del folículo preovulatorio (mm) al momento de la IATF	19
Figura 7	Diámetro del folículo dominante (mm) en fase luteal al quinto día	21
Figura 8	Crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo primario (mm) post inseminación artificial	23
Figura 9	Crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo accesorio (mm) post inseminación artificial	24
Figura 10	Crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo primario y cuerpo lúteo accesorio (mm) post inseminación	25

RESUMEN

En la presente investigación, se colectaron y procesaron 14 eyaculados de llama obtenidos mediante el uso maniquí y vagina artificial y para obtener el plasma seminal, se evaluó el volumen y concentración de proteínas totales mediante la técnica de Bradford (Kit comercial Winkler Ltda.). Se seleccionaron 30 vacas de raza Montbeliarde con una condición corporal 2,7 en promedio, en periodo de lactancia con más de 60 días post parto, las que fueron sincronizadas. Al realizar la inseminación artificial en los animales seleccionados, fueron asignados al azar para conformar los grupos de estudio: a) PSSL (1mg/100 kg de peso vivo, n=10), b) análogo de GnRH (100 ug, n=10) y c) PBS (1 ml, n=10). Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de estadística descriptiva con la prueba de Chi-cuadrado y un análisis de varianza para comparar el efecto del tratamiento. Todos los animales fueron evaluados mediante ultrasonografía transrectal para determinar: la tasa de ovulación en fase luteal, diámetro del CLP y CLA y tasa de preñez a los 45 días. La tasa de preñez no presento diferencias significativas (*Chi-cuadrado*= 1,43; *p*= 0,2316), entre los grupos, sin embargo, la tasa de ovulación y posterior formación de CLA fueron estadísticamente diferentes (*Chi-cuadrado* = 23,33; *p* < 0,0001), en los grupos PSSL, GnRH y PBS. En base a los resultados se puede señalar que la administración intramuscular de PSSL y análogo de GnRH, induce la ovulación y formación de un CLA de características propias de la especie.

PALABRAS CLAVE

- **PLASMA SEMINAL DE LLAMA**
- **CUERPO LÚTEO ACCESORIO**
- **TASA DE PREÑEZ**

SUMMARY

In the present investigation, fourteen llama ejaculates were obtained by the use of an artificial vagina mounted in a llama dummy, which was processed to obtain the llama seminal plasma, the volume and total proteins concentration were evaluated by the Bradford technique (Kit commercial Winkler Ltda.). Thirty Montbeliarde cows with a body condition of 2.7 on average were selected, in lactational period with more than 60 days post-partum, which were synchronized. Then the animals were randomly assigned to form the study groups: a) PSL (1mg / 100 kg of live weight, n = 10), b) GnRH analogue (100 ug, n = 10) and c) PBS (1 ml, n = 10). The results obtained were subjected to an analysis of descriptive statistics with the Chi-square test and an analysis of variance to compare the effect of the treatment. All the animals were evaluated by transrectal ultrasonography to determine: the luteal ovulation rate, CLP and CLA diameter, and pregnancy rate at 45 days. The pregnancy rate did not present significant differences (Chi-square = 1.43, p = 0.2316), between the groups, however, the ovulation rate and subsequent formation of CLA were statistically different (Chi-square = 23, 33; p <0.0001), in the PSL, GnRH respect to PBS groups. Based on the results, the intramuscular administration of PSL and GnRH analogue induces ovulation and the formation of a CLA with characteristic characteristics of the species.

KEYWORDS

- **LLAMA SEMINAL PLASMA**
- **ACCESSORY CORPUS LUTEUM**
- **PREGNANCY RATE**

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Los bajos índices de fertilidad observados en las vacas de alta producción lechera son uno de los principales problemas que aquejan a los grandes y pequeños ganaderos ecuatorianos, esto se debe entre otras cosas a que las vacas en producción tienen una tasa de metabolización hepática mayor que las vacas no lactantes, lo que se relaciona directamente con una mayor capacidad hepática para metabolizar sustancias químicas como: hormonas esteroidales, impactando directamente en la concentración sérica circulante de E2, y por ende con la disminución de la manifestación del estro, por un inapropiado estímulo hipotalámico por parte de esta hormona que induce una baja frecuencia de los pulsos de GnRH, que a su vez induce niveles bajos de LH que aunque inducen la ovulación, dan lugar a un cuerpo lúteo (CL) pequeño que produce menores concentraciones de P4, esto último está relacionado con fallas en la implantación, y anomalías del desarrollo embrionario, reduciendo la supervivencia del embrión provocando la muerte temprana, con el consecuente retorno de la ciclicidad y el retraso en la lactancia subsiguiente.

Ante esta problemática, se ha desarrollado estrategias para incrementar los bajos niveles de P4 detectados en estos individuos (alta producción y baja fertilidad); estos incluyen uso de dispositivos intravaginales y administración parenteral de progesterona (P4); los cuales tienen un alto costo económico que los ganaderos no están dispuestos a asumir; no obstante la idea de generar un cuerpo lúteo accesorio (CLA), mediante el uso de factores luteotróficos como: GnRH – HCG- eCG, han dado buen resultado que ha permitido promover esta estrategia en este tipo de ganado, actualmente se han conocido otras sustancias que podrían potencialmente inducir la ovulación y formación de un CL funcional; como es el OIF o el factor de crecimiento nervioso (β -NGF en sus siglas en inglés) contenido en el PS de la llama: por lo que el objeto de este estudio es evaluar la acción ovulatoria (fase luteal) y luteotrófica del OIF de llama en ganado bovino.

1.2 Antecedentes

El desarrollo de nuevas técnicas reproductivas en el ganado lechero tiene una gran relevancia a nivel nacional e internacional al incrementar la producción; uno de los mayores problemas en los hatos lecheros son los bajos porcentajes de fertilidad, en donde intervienen factores tanto internos como externos, un ejemplo se da en vacas de alta producción en donde se ha observado un incremento en la tasa de metabolización hepática (Hernández, 2012), lo que aumenta el metabolismo en general de sustancias químicas circulantes incluyendo nutrientes y hormonas, dentro de estas las de tipo esteroidales (estrógenos, andrógenos y P4), lo que resulta en una disminución de sus concentraciones circulantes. La P4 es una hormona que juega un rol vital en la fisiología de la gestación, producida por el CL, siendo responsable de la preparación del útero para el establecimiento y mantenimiento de la gestación en mamíferos (Hernández & Zarco, 1998) y juega un rol decisivo en estimular la producción de un amplio rango de componentes endometriales, factores de crecimiento, agentes inmunosupresores, enzimas, iones y esteroides (Gruzmacher, 2014).

La importancia de la P4 en el ámbito reproductivo tiene que ver con la función de mantener la preñez después de la concepción (Gutiérrez, 2008). Los bajos niveles circulantes de P4 luego de la fecundación se han relacionado con eventos uterinos y de implantación embrionaria (Hernández, 2012), al no darse las condiciones adecuadas para la implantación se compromete la supervivencia embrionaria (Gutiérrez, 2008).

Ante esta problemática (perdida embrionaria temprana), en la actualidad se han generado diferentes estrategias reproductivas para mejorar la tasa de fertilidad de los rebaños, en donde la sincronización de celos, mediante la administración de hormonas como hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o gonadotropina coriónica humana (hCG) inducen la ovulación y formación de un CLA en una fase luteal establecida (Hernández, 2012), y con esto ayudaría a disminuir las pérdidas embrionarias por deficiencia de P4, ya que al tener niveles alto de P4 se mejoran las condiciones de preimplantación a nivel uterino (Gruzmacher, 2014).

Se ha considerado que el plasma seminal (PS) no solo es un medio de transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductivo del macho y de la hembra durante la monta, en la actualidad se ha demostrado la presencia de sustancias tales

como proteínas, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas que afectan a los espermatozoides y funciones reproductivas en la hembra (Tanco, 2008), induciendo la ovulación en llamas y alpacas, con una respuesta que varía de acuerdo al sitio de administración (Adams, Ratto, Huanca, & Singh, 2005). Recientemente se ha descubierto la presencia de un factor inductor de ovulación (OIF en sus siglas en inglés), presente en el PS de diferentes especies principalmente en los camélidos sudamericanos (CSA), el que en los niveles circulantes es responsable de inducir un incremento de la hormona luteinizante (LH), seguido de ovulación y formación de CL cuando es administrado vía intramuscular (IM) o por vía intravaginal (IV) en llamas y alpacas (Tanco, 2008). Estudios recientes realizados en bovinos determinaron que la administración IM de PS de llamas indujo cambios en la dinámica folicular y luteal, así como en la secreción de P4 (Tanco, 2008).

Por otra parte, también se ha descrito la presencia de OIF en el PS de especies consideradas ovuladores espontáneos como son el bovino, equino y porcino (Ratto, Huanca, & Adams, 2010), este mismo autor ha demostrado que la administración de PS de toro indujo la ovulación en el 26% de llamas tratadas, lo cual es confirmado lo dicho por (Chen, Yuen, & Pan, 1985), que el semen de toro contiene este OIF lo que permitirá la ovulación en CSA. Estas evidencias sugieren que el PS de las especies domesticas cumple un rol mucho más activo del que se pensaba como medio de transporte de espermatozoides (Ratto, Huanca, Singh, & Adams, 2006), sino que también podría participar en procesos de la actividad ovárica y uterina (Vargas, 2012).

El papel del OIF, en la fisiología reproductiva del bovino no ha sido determinado por completo, no obstante un estudio realizado en la Universidad de Saskatoon, Canadá (Tanco, 2008), demostró que la administración IM de OIF de llama en vaquillas pre púberes no induce la ovulación, sin embargo, indujo un alza de la hormona folículo estimulante (FSH) seguido de la emergencia de una nueva onda folicular; Por otro lado, cuando OIF es administrado en vacas adultas se observaron efectos sobre secreción de gonadotropinas y el desarrollo del folículo dominante, y también sobre la función luteal aumentando la producción de P4 (Tanco, 2008), en base a lo anterior mencionado, sería interesante poder evaluar la acción del OIF contenido en el PS de llama en su potencial y de paso su efecto ovulatorio en fase luteal para la formación de un CLA en vacas lecheras.

1.3 Justificación

La producción lechera del país se ha convertido en una de las actividades más importantes para pequeños y grandes productores tanto de países desarrollados como en países en vías de desarrollo como el Ecuador. El gerente de la Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente (AGSO), Juan Pablo Grijalva, resaltó que en Ecuador el crecimiento en la producción de leche se mantiene con una tendencia entre el 25% y el 30% en los últimos años, sin embargo, y siendo la reproducción uno de los factores que determinan el éxito de la ganadería y estando estrechamente relacionada con la producción ha conllevado a desarrollar nuevas estrategias reproductivas para el incremento de la producción lechera.

Por lo tanto, en la actualidad la ganadería de leche se ha preocupado por obtener altos índices de producción, no obstante, la búsqueda de dichos rendimientos en la producción ha repercutido en el aumento en la infertilidad en las vacas lecheras, siendo necesario entender los eventos fisiológicos de la reproducción en vacas. La hembra bovina, es un animal poliéstrico no estacional, con un ciclo estral aproximado de 21 días. Es ovulador espontáneo, su ciclo reproductivo está regulado por hormonas producidas en diferentes tejidos u órganos como son; GnRH secretada por el hipotálamo; FSH y LH, secretadas desde la adenohipófisis o hipófisis anterior, esteroides tales como P4 y estradiol (E2) producidos por diferentes estructuras ováricas tal como el CL y folículos respectivamente y prostaglandina F2 α (PGF2 α), producida a nivel uterino (Cerón, (2012) y Intervet, (2007)), estas hormonas actúan a través de un sistema de retroalimentación, tanto positiva como negativa que rigen el ciclo estral (Gutiérrez, 2008). Recientes estudios demostraron la presencia de sustancias proteicas procedentes del PS de CSA, que inducen el aumento preovulatorio de LH produciendo la ovulación y formación de un CL en llamas y alpacas. Estudios realizados en ganado bovino demostraron que la administración IM, del PS de llama indujo cambios en la dinámica folicular y luteal (Tanco, 2008).

Por lo tanto, la presente investigación se basa en la administración IM del PS de llama en vacas cíclicas con la finalidad de evaluar si la ovulación de un folículo dominante en fase luteal induce la formación de un CLA.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de la administración de plasma seminal de llama y un análogo de GnRH sobre la tasa de ovulación y formación de cuerpos lúteos accesorios en vacas.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de proteína total en el plasma seminal de llama colectado mediante vagina artificial.
- Evaluar la inducción de ovulación, formación y biometría de cuerpos lúteos accesorios en fase luteal post inseminación.
- Determinar la tasa de preñez en vacas cíclicas post inseminación con inducción a la formación de un cuerpo lúteo accesorio.

1.5 Hipótesis

H0. - La administración del plasma seminal de llama o un análogo de GnRH no induce la ovulación y formación de un cuerpo lúteo accesorio en vacas cíclicas.

H1. - La administración del plasma seminal de llama o un análogo de GnRH induce la ovulación y formación de un cuerpo lúteo accesorio en vacas cíclicas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

Para llevar a cabo un programa reproductivo en una producción ganadera, es esencial conocer el ciclo estral de la vaca, así como los factores que lo regulan. Durante los últimos años se ha observado un desarrollo de las tecnologías reproductivas que han incrementado la eficiencia y la genética de las vacas. Algunas de estas tecnologías incluyen la sincronización de celos y la ultrasonografía. El éxito o el fracaso de un programa reproductivo y de mejora genética depende también del entendimiento del ciclo estral, su fisiología y de los mecanismos hormonales que lo controlan.

2.2 Fisiología del ciclo estral de la vaca

El ciclo estral bovino está regulado por la interacción de varios órganos: entre ellos están el eje hipotálamo-hipófisis, el ovario y el útero. El ciclo sexual de la vaca suele ser independiente de la estación del año, el estro o celo se observa cada 21 días en promedio, con un rango de 18-24 días. El día del estro se considera como el día 0 el cual dura 18 horas de promedio, con un rango de 4-24 horas. La ovulación se da 30 horas después del inicio del estro, es decir, después del final del estro. Después de la ovulación se da la fertilización del óvulo en el oviducto. El blastocisto llega al útero alrededor del día cinco.

2.3 Fases del ciclo estral bovino

El ciclo estral se caracteriza por tener dos fases: la fase folicular y la fase luteal.

2.3.1 Fase folicular o regresión luteal

La fase folicular se divide en: Proestro y estro

Proestro: esta fase que tiene una duración de 3 o 4 días (corresponde el día 17-21 del ciclo estral), comienza cuando ocurre la regresión del CL o luteólisis del ciclo anterior, siendo la PGF2 α el agente luteolítico.

En el momento de la luteólisis del CL, se produce una rápida disminución de la concentración de P4 circulante (Figura 1), suprimiendo la retroalimentación negativa

que esta hormona ejerce a nivel hipotalámico y reiniciado la liberación pulsátil normal de los pulsos de FSH y LH, por medio de la GnRH estimulando el proceso de crecimiento y desarrollo folicular mediado en primer lugar por la FSH cuando el folículo alcanza su máximo diámetro se denomina preovulatorio, el cual secreta e incrementa los niveles de estrógeno circulantes, provocando las manifestaciones externas de celo por estímulo de estos estrógenos a nivel central (Intervet, 2007).

Estro: esta fase tiene una duración de 2 a 24 horas, inicia con la receptividad sexual e involucra todos los eventos fisiológicos que permiten la ovulación y comienzo de la formación del CL por el proceso de luteinización.

Las altas concentraciones de E2 (Figura 1) inducen la maduración y aumento al tamaño del folículo preovulatorio en desarrollo. Durante esta fase se ejerce una retroalimentación positiva entre el E2 y la LH produciéndose el pico preovulatorio de LH responsable de la ovulación. La ovulación mantiene una relación temporal constante con el pico de LH, en general, la ovulación ocurre de 28 a 30 h después del pico de LH, o, visto de otra manera, de 30 a 36 h después del inicio del estro. Luego de 12 a 24 horas después de comenzado el celo, el sistema nervioso de animal se torna remiso al E2 y finaliza todas las manifestaciones de celo (Gutiérrez, 2008).

2.3.2 Fase luteal

Fase luteal se divide en: Metaestro y diestro.

Metaestro: se inicia inmediatamente después de finalizar el celo con la ovulación y concluye cuando el CL alcanza su máximo diámetro. En el folículo posterior a la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico, que es transitoria. Durante esta fase se inicia la organización celular y desarrollo del CL; las células de la granulosa y de la teca del folículo sufre un proceso llamado luteinización por acción del alza de la LH preovulatoria (Gutiérrez, 2008).

Diestro: es la fase más larga del ciclo estral, debido a que comprende desde que el CL es funcional, hasta la destrucción del mismo por medio del proceso de apoptosis mediado por la PGF2 α denominado luteolisis. Durante esta fase se mantiene altas

concentraciones de P4 (Figura 1) y se produce un efecto de retroalimentación negativa en la liberación de LH; así como la secreción de GnRH. Además, se observa incrementos en la secreción de FSH y en consecuencia un desarrollo folicular; sin embargo, estos folículos no pueden concluir su maduración y sufren a una regresión, por falta del pico de LH (Sintex, 2005).

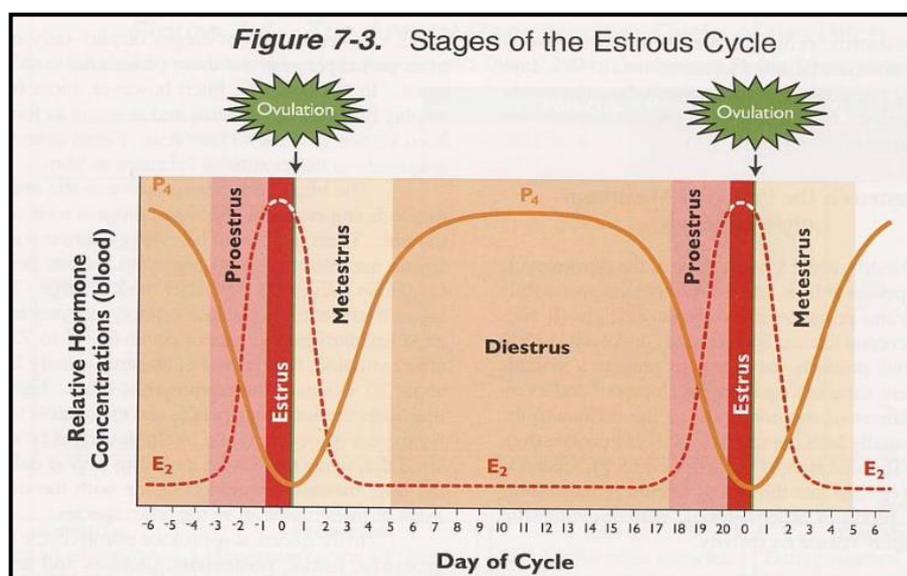


Figura 1 Fases del ciclo estral

Fuente: (Senger, 2003) 149 pp.

2.4 Dinámica folicular del ciclo estral de la vaca

Según Soria (2012), se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio. Entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular ocurren durante un ciclo estral bovino, y el folículo preovulatorio deriva de la última. Para describir la dinámica folicular bovina es necesario definir conceptos de reclutamiento, selección y dominancia:

Reclutamiento: en cada ciclo ovárico es reclutado un grupo de folículos primordiales (Fig. 2), los cuales por efecto de las altas concentraciones de la hormona FSH, mantienen un crecimiento continuo. El pico de FSH ocurre cuando el folículo dominante presenta un tamaño de aproximadamente 8 a 9 mm en bovinos. La

liberación de FSH gradualmente es suprimida, debido a que los folículos inician la secreción de estradiol e inhibina. La inhibina es una hormona proteica, producida por el folículo y ejerce un feed back negativo a nivel hipofisiario, induciendo una menor secreción de FSH (Intervet, 2007).

Selección: proceso por el cual es elegido un folículo “dominante” (Figura 2), el folículo antes mencionado presenta una tasa de crecimiento constante y bloquea el soporte hormonal a FSH para el resto de folículos subordinados induciendo una atresia o disminución de la velocidad de crecimiento y reprimiendo su crecimiento (Sintex, 2005).

Dominancia: en esta fase el folículo dominante impide el crecimiento y desarrollo de los folículos subordinados, así como el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos primordiales. El folículo dominante alcanza su máximo diámetro y es responsable de la mayor producción de E2 (Soria, 2012).

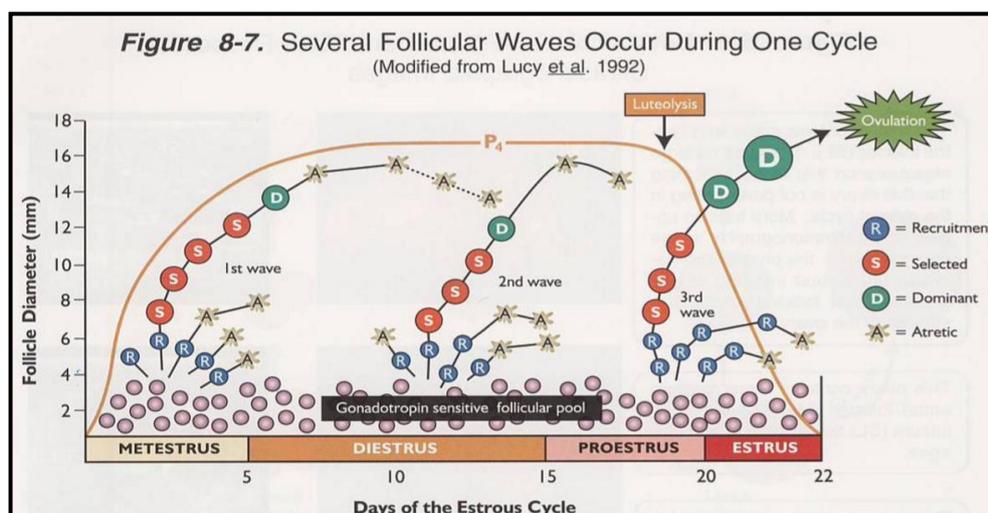


Figura 2 Dinámica Folicular durante un Ciclo Estral

Fuente: (Senger, 2003) 172 pp.

2.5 Ondas foliculares

Según Rivadeneira (2013), una onda de crecimiento folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo de folículos, durante 2-3 días que son detectados por ultrasonografía a un diámetro de 3-4 mm. La velocidad de crecimiento es similar

durante aproximadamente dos días, está caracterizada por el desarrollo de un gran folículo, llamado dominante, el cual es anovulatorio si ocurre durante la fase luteal, y ovulatorio si ocurre en la fase folicular y varios folículos subordinados que invariablemente se atresian. Los primeros estudios en la dinámica folicular dieron lugar a la hipótesis de que el folículo dominante suprime el crecimiento de los folículos subordinados en la onda existente, y la aparición de la onda folicular siguiente; el apoyo a esta hipótesis fue proporcionado en una serie de estudios que implica el tratamiento sistémico con la porción proteica del líquido folicular y por electrocauterización del folículo dominante (Rivadeneira, 2013).

2.6 Mecanismo de ovulación en las especies mamíferas

Según Niño (2010), las especies domesticas han sido clasificadas tradicionalmente de acuerdo a su mecanismo de ovulación, en animales de ovulación espontánea e inducida (refleja). Esta división entre especies está basada en el tipo de estímulo responsable para iniciar la liberación de Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH) desde el hipotálamo medio basal. Esta, es producida por las neuronas hipotalámicas a partir de un precursor polipeptídico por procesos enzimáticos y empaquetados en gránulos de almacenamiento que son transportados por los axones neurales a la eminencia media. La hormona GnRH se libera al sistema portal Hipotálamo-Porta-Hipofisiario en forma de pulsos, los cuales pueden ser regulados por señales externas al hipotálamo, como los esteroides. La naturaleza pulsátil de la secreción de GnRH resulta en la liberación en fases de las gonadotropinas LH y FSH. La frecuencia y descarga del pulso de GnRH varía de aproximadamente 20 minutos hasta por encima de los 90 minutos dependiendo de la especie, género y estado fisiológico (Niño, 2010).

En especies de ovulación espontánea (hombre, ovejas, bovinos, caballos, cerdos), la ovulación es dependiente de esteroides, es decir, cuando la concentración sistémica de estradiol proveniente de un folículo preovulatorio alcanza un cierto umbral, se produce un sistema de retroalimentación hormonal positiva por la cual el estradiol induce la liberación masiva de GnRH desde el hipotálamo con subsiguiente pico preovulatorio de LH y ovulación (Adams, Ratto, Huanca, & Singh, 2005).

2.7 Mecanismo de ovulación en ovuladores inducidos

Diferentes estímulos (olfatorios, auditivos, oculares y táctiles) han sido asociados con la inducción de la ovulación en las hembras de ovulación refleja, siendo el estímulo físico de la intromisión del pene considerado como el estímulo principal en la inducción de la descarga preovulatoria de LH (Niño, 2010).

En hembras de ovulación inducida como los camélidos del Viejo mundo (camellos bactrianos) y Nuevo mundo (Llama, vicuña, guanaco), los conejos, hurones y gatos, las señales nerviosas del estímulo de la copula desencadenan la secreción de GnRH desde el hipotálamo, seguida por una liberación preovulatoria de LH desde la pituitaria anterior. Similarmente a los ovuladores espontáneos, una onda en la concentración de LH parece ser un requisito para la ovulación en ovuladores inducidos, pero este suceso es contingente sobre el estímulo copulatorio, por lo tanto, la ovulación no es un evento cíclico (Adams, Ratto, Huanca, & Singh, 2005).

2.8 Factor inductor de la ovulación (OIF)

El PS, fase líquida del semen, ha sido considerado generalmente como un medio de transporte y de sobrevivencia para los espermatozoides, sin embargo, actualmente se reconoce que su rol es mayor, influenciando los tejidos del tracto reproductivo de la hembra después de la inseminación. El PS contiene muchos factores que influyen en el ambiente reproductivo temprano, incluyendo en el útero cambios a nivel inmune y la inducción de factores de crecimiento embriotróficos (Silva M. , 2012).

Investigaciones recientes han desafiado el clásico dogma de ovulación inducida en alpacas y llamas debido a que una molécula presente en el PS podría ser responsable de iniciar la cascada de ovulación en estas especies. La existencia de esta sustancia fue inicialmente reportada por investigadores chinos, quienes concluyeron que algún factor presente en el semen de los camellos Bactrianos (especies consideradas ovuladores inducidos) era responsable de inducir la ovulación, como consecuencia de la administración de semen o PS a nivel intravaginal (Adams, Ratto, Huanca, & Singh, 2005). Recientes estudios demuestran que las llamas pueden ser inducidas a ovular por el PS en ausencia de la copula y que la copula por sí sola no puede inducir la ovulación en ausencia del PS (Berland, y otros, 2016).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del lugar de investigación

3.1.1 Ubicación política

La investigación será realizada en las instalaciones de la Hacienda El Prado IASA I.

Provincia: Pichincha

Cantón: Rumiñahui

Parroquia: San Fernando

3.1.2 Ubicación geográfica

Norte: Población San Fernando

Sur: Montaña Pasochoa

Este: Población de Loreto

Oeste: Rio Pita

3.1.3 Ubicación ecológica

Altitud: 2 850 m

Temperatura Promedio: 14° C

Temperatura Máxima: 21° C

Temperatura Mínima: 7° C

Precipitación Anual: 1200 mm

Humedad Relativa: 70 %

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Colección de PSL

Se colectó semen de un macho de llama de 4 años de edad, para lo cual se utilizó una vagina artificial, envuelta en una frazadilla eléctrica y colocada dentro de un maniquí, simulando una llama hembra de posición decúbito esternal (receptividad

sexual). Las colectas se realizaron dos veces por semana, durante un periodo de cuatro meses. El semen colectado fue diluido 1:1 (v/v) con buffer fosfato salino (PBS) y fue centrifugado (CENTRICONE), a 3.000 r.p.m durante 40 minutos para la separación de los espermatozoides del PS. Una muestra del sobrenadante se evaluó al microscopio óptico (LEICA-ATC-2000), para confirmar la ausencia de espermatozoides, de existir presencia de espermatozoides se procedió a centrifugar y nuevamente se analizó la muestra al microscopio. Las muestras libres de gametos fueron almacenadas en tubos falcón de 15 ml bajo congelación a -20°C hasta su posterior uso, en donde se determinó la concentración de proteínas totales contenida en una muestra de PS, mediante el método de Bradford (Kit comercial Winkler Ltda.), en cual fue medido a través de espectrofotometría (THERMO SPECTRONIC MODELO GENESYS 10), siguiendo los protocolos del fabricante.

3.2.2 Animales y tratamientos

Se utilizaron 30 vacas adultas con más de 60 días post parto del hato lechero de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE. Para la incorporación de los animales en el estudio se consideró la evaluación de la condición corporal (CC) para la cual se utilizó una escala de valorización de 5 puntos siendo; 1= muy flaco y 5= muy gorda (Grigera & Bargo, (2005); Figura 3) en este estudio se seleccionaron animales con CC de 2,5 a 3,5. Adicionalmente se evaluó el estatus reproductivo de dichos animales mediante ultrasonografía transrectal utilizando una sonda de 5 MHz (Sonoscape A5V) en donde se seleccionó hembras que se encontraban ciclando y sin alteraciones reproductivas de cualquier tipo.

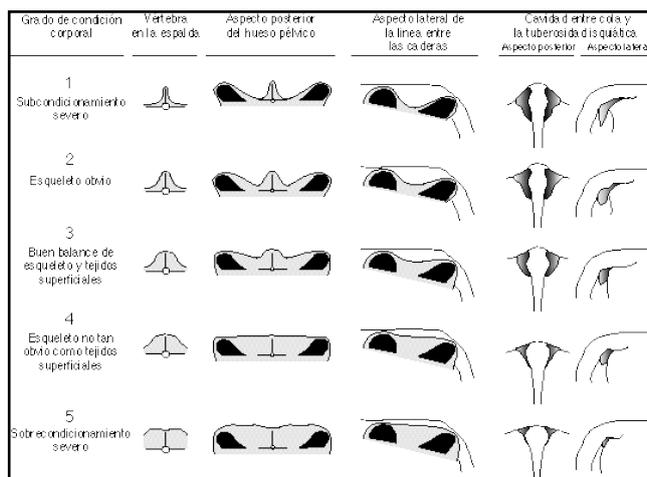


Figura 3 Grados de condición corporal

Fuente: INFORCARNE

Posteriormente se realizó la sincronización de celos en los animales seleccionados mediante la aplicación de un dispositivo intravaginal bovino (DIB) de 1 g de progesterona (Sincrogest) acompañado de la administración intramuscular (IM) de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol). El DIB fue retirado al octavo día junto con la administración IM de 2 ml PGF2 α y se realizó la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) al décimo día, junto con la administración de un análogo de GnRH (Sincroforte) (Figura 4).

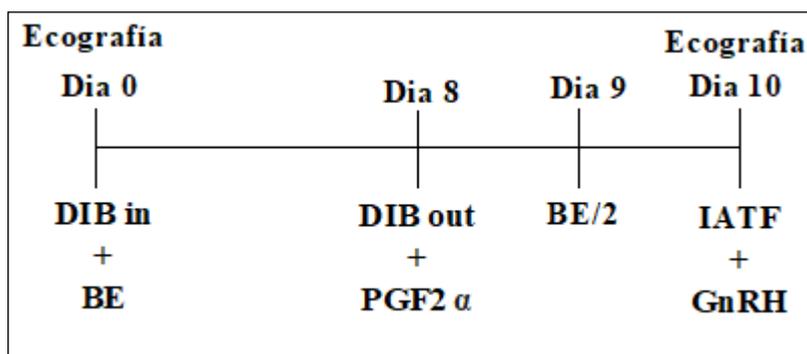


Figura 4 Diagrama de protocolo de sincronización de celo

Posterior a la IATF se evaluó mediante ultrasonografía cada 24 horas el desarrollo del CL primario y se realizó el seguimiento de la primera onda de crecimiento folicular post ovulación hasta la obtención de un folículo dominante en

fase luteal, una vez determinada la aparición de este se procedió aplicar en los animales los tratamientos (Figura 5) los cuales fueron administrados de manera intramuscular siguiendo las concentraciones utilizadas por Tanco (2008): a) T1: Análogo de GnRH (Control positivo, 100 ug), b) T2: PS de llama (1mg/100 kg de peso vivo) y c) T3: PBS (Control negativo, 1 ml de solución salina).

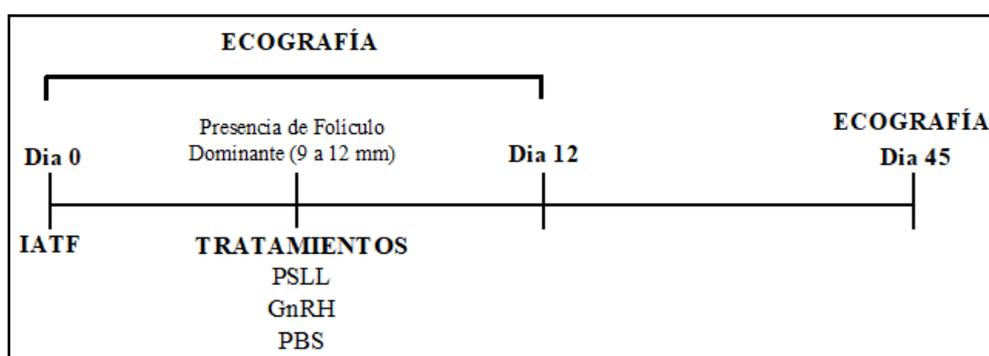


Figura 5 Diagrama de la aplicación de los tratamientos

3.2.3 Diseño Experimental

Se rigió bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 10 repeticiones por tratamiento.

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

Donde:

Y_{ij} = Diámetro del cuerpo lúteo accesorio.

μ = media general

T_i = efecto del i-esimo tratamiento

e_{ij} = error experimental

3.2.3.1 Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos de diámetro de CLA en fase luteal, fueron analizados mediante un análisis de varianza de muestras repetidas, completándose con una prueba

de comparación de medias de Tukey al 5%. Mientras que los datos de tasa de ovulación en fase luteal y tasa de preñez, fueron analizados mediante chi cuadrado. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat (Di Rienzo, y otros, 2016).

3.2.4 Variables a medir

Tasa de ovulación en fase luteal post inseminación:

Se realizó el seguimiento del folículo dominante, mediante ultrasonografía transrectal a las 24 horas post tratamiento, es decir al sexto día post inseminación artificial. Estos datos serán calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de ovulación en fase luteal} = \frac{\text{Número de vacas ovuladas en fase luteal}}{\text{Número de vacas tratadas en fase luteal}} \times 100$$

Diámetro de cuerpo lúteo accesorio en fase luteal:

Para la medición del diámetro de CLA, se realizó el seguimiento de estructuras ováricas en fase luteal a partir del tercer día post tratamiento cada 24 horas durante cinco días, mediante ultrasonografía transrectal y se realizó el análisis de las imágenes obtenidas en el ecógrafo, en un software de edición de imágenes ImageJ.

Tasa de preñez:

Esta variable fue medida en el día 45 post inseminación, mediante ultrasonografía transrectal.

$$\text{Tasa de preñez} = \frac{\text{Número de vacas preñas}}{\text{Número de vacas inseminadas}} \times 100$$

3.2.5 Métodos específicos de manejo del experimento

3.2.5.1 Confinamiento de la llama

El macho se ubicó durante todo el tiempo de investigación en potreros cercados con alambre de púa, de la Universidad de las Fuerzas Armadas en la Hacienda El Prado IASA I.

3.2.5.2 Elaboración del maniquí de llama

Se confeccionó un maniquí de madera en forma de reposo tomando en cuenta las dimensiones del cuero de llama. Para la sección del cuello se utilizó un tubo PVC y la cabeza fue elaborada con una espuma Flex de forma de cono. En la parte posterior del maniquí se realizó un orificio de 7 centímetros (cm) de diámetro a una altura de 17 cm, que permita acoplar y mantener en el interior la vagina artificial.

3.2.5.3 Adiestramiento de los machos

El manejo de adiestramiento de la macho, se realizó en un potrero de 50 metros cuadrados. Según D. Rocha y V. Saavedra (2005), la metodología a emplear para el adiestramiento está sujeta en cinco pasos importantes:

Acercamiento o primer encuentro: La llama no sabe lo que se espera de ella, entonces estará a la expectativa de lo que se va a hacer. Por lo tanto, ese primer encuentro debe ser de agrado para la llama que se sienta segura y a gusto con la presencia del adiestrador.

Masaje: El adiestrador está en contacto con el animal deberá comenzar a realizar masajes hasta que el animal acepte paulatinamente el masaje en todo su cuerpo.

Embozalado: Se procedió a poner la jáquima a la llama.

Cabestreo: Se realizó la conducción de la llama con jáquima y guiada por una cuerda hacia donde el adiestrador desee.

Motivación o premiación: El adiestrador procedió a motivarle por su trabajo bien ejecutado a la llama.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Concentración de proteínas totales en el PSLL

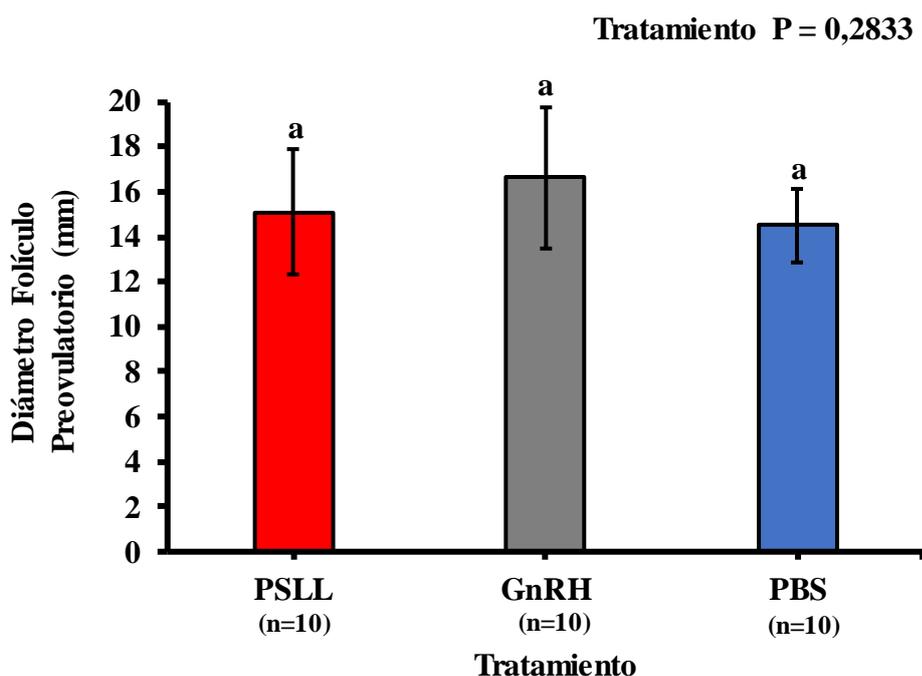
La colecta de semen de llama se llevó a cabo dos veces por semana durante 3 meses, previo a esto se realizó una etapa de entrenamiento que tuvo una duración de 3 meses, la cual consistió inicialmente en la preparación del maniquí e inducción de los machos para realizar la copula en este, dos machos fueron entrenados de los cuales sólo uno completo el entrenamiento exitosamente y a partir de este se obtuvieron las muestras de semen para la extracción de plasma seminal utilizadas en este estudio, obteniéndose un total de 14 colectas las que fueron evaluadas para determinar volumen seminal y concentración de proteínas totales mediante la técnica de Bradford (Kit comercial Winkler Ltda.) y a partir de esta información se estimó la concentración de β -NGF presente en el plasma seminal de llama considerando que la literatura indica que este factor corresponde a un 30 % de las proteínas totales presentes en el plasma seminal de llama (Kershaw-Young , Druart , Vaujhan , & Maxwell, 2012). Mediante un análisis descriptivo se determinó los promedios del volumen colectado, concentración de proteína totales y estimación de β -NGF presente en el plasma seminal (ver tabla 1), se encuentran dentro de los parámetros normales para la especie.

Tabla 1
Promedio \pm EE del volumen del semen, concentración de proteína y β -NGF presente en el plasma seminal

	Promedio \pm EE
Volumen de semen colectado	5,09 \pm 2,6
Concentración de proteínas totales (mg/ml)	4,02 \pm 1,8
β-NGF por ml de plasma seminal (30%)	1,2 \pm 0,54

4.2 Diámetro del folículo preovulatorio

Finalizado el protocolo de sincronización en las vacas, se realizó una evaluación mediante ultrasonografía transrectal, para evaluar la presencia y tamaño de un folículo preovulatorio previo a la realización de la inseminación, en donde se pudo observar que todos los animales del estudio presentaban un folículo al momento de realizar la inseminación artificial, si bien aún no se realizaba el respectivo tratamiento, los animales ya estaban previamente asignados a conformar los distintos grupos de estudio, en donde se determinó que los diámetros promedios de los folículos presentes fueron: PSL: 15,1; GnRH: 16,6 y PBS: 15,5 mm respectivamente, no existiendo diferencia estadística entre ellos ($p = 0,2833$; Figura 5).



Medias con una letra común no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$)

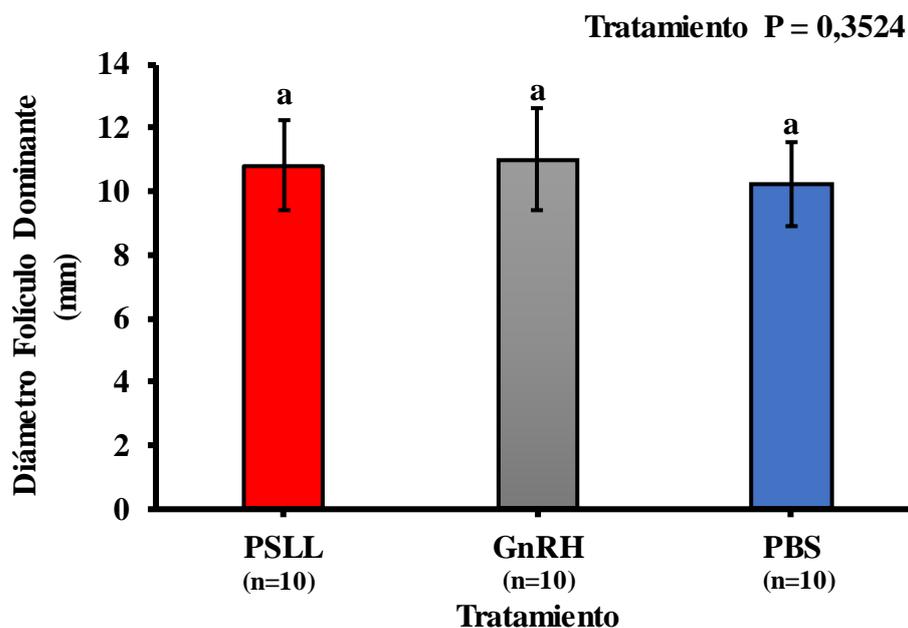
Figura 6 Diámetro del folículo preovulatorio (mm) al momento de la IATF

4.3 Aparición y diámetro del folículo dominante en fase luteal

Posterior a la inseminación artificial los animales fueron evaluados mediante ultrasonografía transrectal para determinar la primera onda de crecimiento folicular en fase luteal, esta evaluación se realizó diariamente hasta determinar la presencia de un folículo en crecimiento siendo criterio de inclusión para la inducción a la ovulación aquel folículo que alcanzara los 10 mm de diámetro, obteniéndose que en promedio los animales del estudio presentaban al quinto día post ovulación un folículo del diámetro esperado para aplicar el respectivo tratamiento (ver tabla 2). En la figura 6 se muestran los tamaños promedios \pm ee del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular en fase luteal, no presentó diferencias estadísticas entre ellos ($p = 0,3524$).

Tabla 2
Promedio \pm EE del día de aparición de un folículo dominante en fase luteal post inseminación

Tratamiento	Promedio \pm EE
PSLL	$5 \pm 0,30$
GnRH	$5 \pm 0,26$
PBS	$5 \pm 0,30$



Medias con una letra común no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$)

Figura 7 Diámetro del folículo dominante (mm) en fase luteal al quinto día

4.4 Tasa de ovulación en fase luteal

Una vez aplicado los respectivos tratamientos (GnRH, PSLL y PBS) se evaluó la tasa de inducción de ovulación 24 horas de aplicados estos, observándose inducción de ovulación del 90% (9/10) para GnRH, 80% (8/10) para PSLL, no observándose inducción de ovulación para los individuos del grupo PBS (0/10) y a su vez para establecer diferencias entre los tratamientos en base a la tasa de ovulación del folículo dominante post inseminación se realizó un análisis de datos con tablas de contingencias, en la que se determinó que al 95% de nivel de confianza, presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Chi-cuadrado = 23,33; $p < 0,0001$; ver tabla 3).

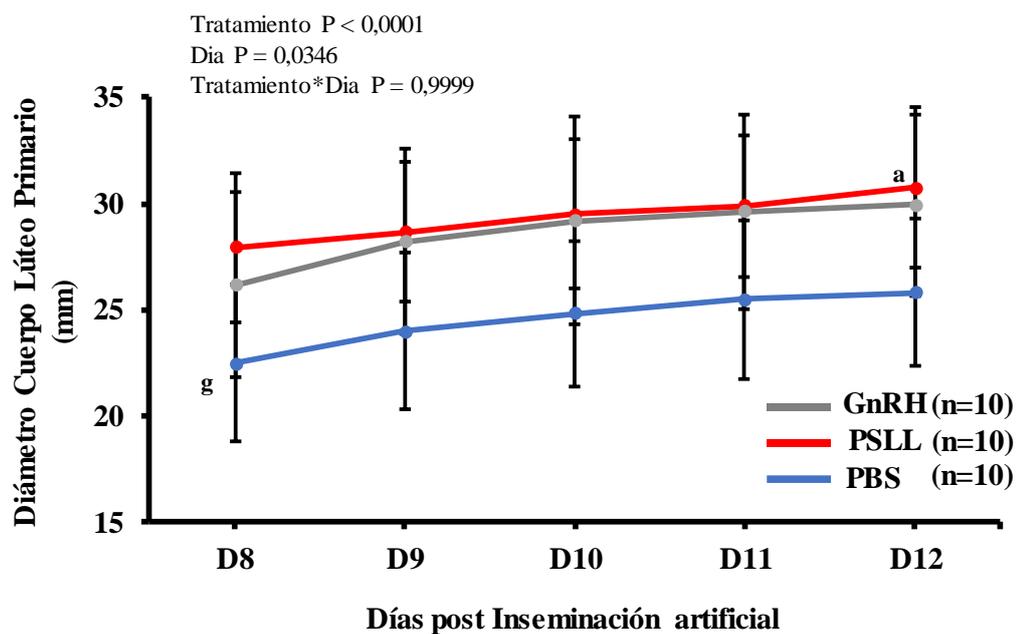
Tabla 3
Tasa de ovulación en fase luteal en vacas como respuesta a la administración intramuscular de PSL, GnRH y PBS

Tasa de ovulación en fase luteal	Tratamiento			Total
	PSL	GnRH	PBS	
SI	80% (8/10)	90% (9/10)	0% (0/10)	56,7% (17/30)
NO	20% (2/10)	10% (1/10)	100% (10/10)	43,3% (13/30)
Total Total (n)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)

P < 0,0001
Chi-cuadrado 23,33
gl: 2
Test: Chi-cuadrado de Pearson

4.5 Crecimiento del CLP post inseminación

Se procedió a evaluar cada 24 horas durante cinco días el crecimiento del cuerpo lúteo primario de los animales del estudio a partir del octavo día post inseminación mediante ultrasonográfica transrectal, donde no se observó diferencias estadísticas significativas de la interacción tratamiento por día ($p = 0,9999$; Figura 7), si bien no existió diferencias estadísticas entre tratamiento respecto al tamaño del cuerpo lúteo primario, se puede observar que los diámetros de los cuerpo lúteos para los grupos PSL y GnRH tienden a ser mayores respecto al grupo PBS.



Medias con una letra común no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$)

Figura 8 Crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo primario (mm) post inseminación artificial

4.6 Ubicación del CLA

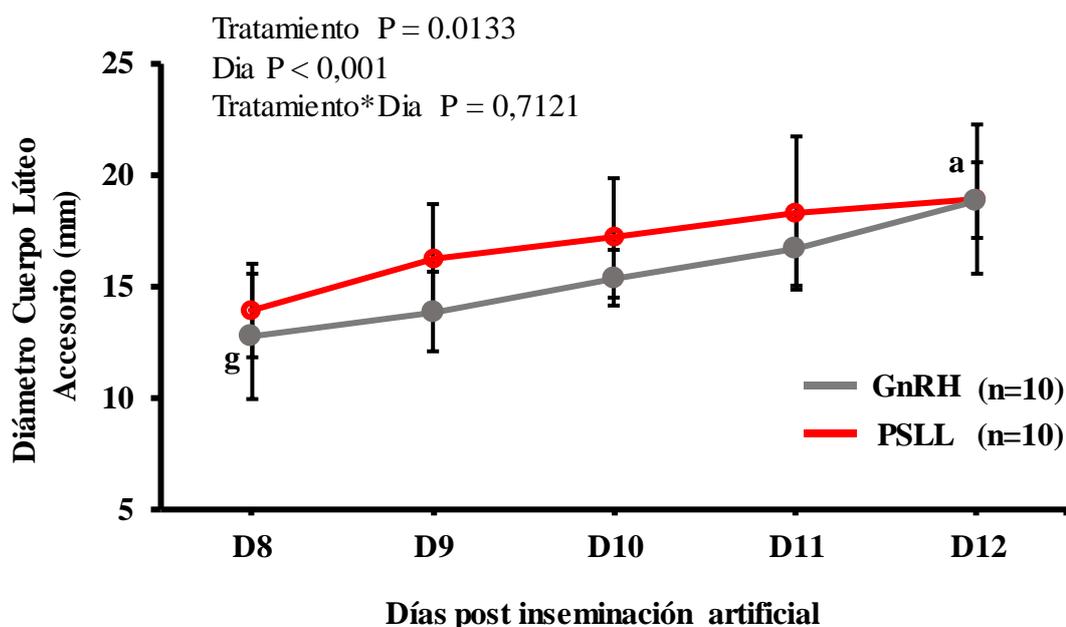
A través de la utilización de ultrasonografía transrectal, se determinó la ubicación del cuerpo lúteo accesorio respecto al cuerpo lúteo primario, obteniendo en un 94,1% (16/17) ipsilateral y 5,9% (1/17) contralateral respectivamente (ver tabla 4).

Tabla 4
Posición del cuerpo lúteo accesorio con respecto al cuerpo lúteo primario

	Ipsilateral	Contralateral	Total
PSL	100% (8/8)	0% (0/0)	100% (8/8)
GnRH	88,9% (8/9)	11,1% (1/9)	100% (9/9)
Total	94,1% (16/17)	5,9% (1/17)	100% (17/17)

4.7 Crecimiento del CLA post inseminación

Una vez detectada la ovulación del folículo dominante en fase luteal, se procedió a evaluar mediante ultrasonografía transrectal, el crecimiento en base a su diámetro del cuerpo lúteo accesorio (CLA) en los grupos de estudio, en donde a los tres días post tratamiento fue evidente mediante esta técnica la visualización de estructuras ecogénicas luteales y a partir de este día se realizó la evaluación diaria del diámetro de este durante 5 días, no presentando diferencias estadísticas significativas de la interacción tratamiento por día entre los grupos tratados ($p = 0,7121$; Figura 8).



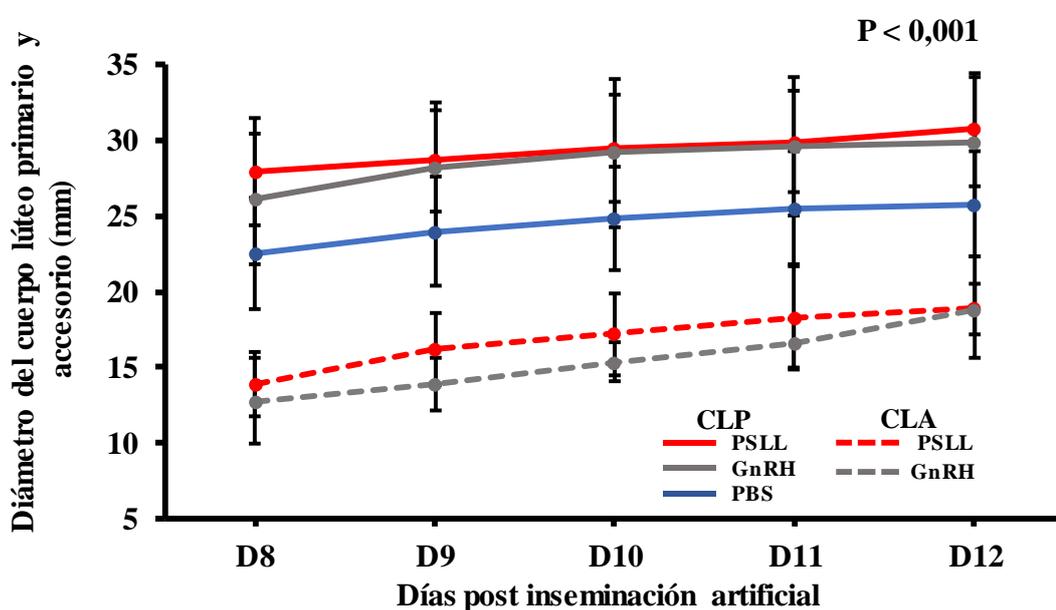
Medias con una letra común no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$)

Figura 9 Crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo accesorio (mm) post inseminación artificial

4.8 Crecimiento del CLP Y CLA post inseminación

En la figura 9 se representan en conjunto la dinámica de crecimiento del cuerpo lúteo primario y accesorio, obtenidas a partir de los registros ecográficos, donde se

encontró diferencias estadísticas significativas entre las estructuras luteales primarias y accesorias dentro de un mismo tratamiento (GnRH y PSLL; $T = 27,83$; $p < 0,001$). Además en base al análisis de evaluación del diámetro luteal utilizando el software de edición de imágenes ImageJ, se pudo calcular la tasa de crecimiento promedio del cuerpo lúteo primario y accesorio para los distintos grupos en el periodo evaluado obteniendo que la tasa de crecimiento diario para la estructura luteal primaria tendió a ser mayor para los grupos GnRH y PBS con respecto al grupo PSLL (ver tabla 5), misma situación se observó para el del cuerpo lúteo accesorio, en donde la tendencia



a un mayor crecimiento se observó en el grupo tratado con GnRH respecto del grupo PSLL (ver tabla 6).

Figura 10 Crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo primario y cuerpo lúteo accesorio (mm) post inseminación

Tabla 5
Tasa de crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo primario durante cinco días

Tratamiento	Crecimiento del diámetro del CLP (mm/día)
PSLL	0,56
GnRH	0,75
PBS	0,67

Tabla 6
Tasa de crecimiento del diámetro del cuerpo lúteo accesorio durante cinco días

Tratamiento	Crecimiento del diámetro del CLA (mm/día)
PSLL	1,01
GnRH	1,21

4.9 Tasa de preñez a los 45 días

A los 45 días post inseminación, mediante ultrasonografía transrectal se determinó la tasa de preñez en los grupos de estudio, donde se obtuvo una tasa de preñez de un 60% (6/10) para PSLL, 70% (7/10) para GnRH y 60% (6/10) para PBS respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (*Chi-cuadrado*= 0,29; *p*= 0,8663; ver tabla 7). En relación de los animales tratados y en los cuales se generó la formación de cuerpo lúteo accesorio (*n*= 17), se obtuvo una tasa de preñez de 50% (4/8) para PSLL y 77,8% (7/9) para GnRH respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticas significativas entre ellos (*Chi-cuadrado*= 1,43; *p*= 0,2316; ver tabla 8).

Tabla 7
Tasa de preñez a los 45 días post inseminación

Tasa de preñez a los 45 días	Tratamiento			Total
	PSLL	GnRH	PBS	
SI	60% (6/10)	70% (7/10)	60% (6/10)	63,3% (19/30)
NO	40% (4/10)	30% (3/10)	40% (4/10)	36,7% (11/30)
Total	100%	100%	100%	100%
Total (n)	(10/10)	(10/10)	(10/10)	(30/30)

P = 0,8663
Chi-cuadrado 0,29
gl: 2
Test: Chi-cuadrado de Pearson

Tabla 8
Tasa de preñez con formación de cuerpo lúteo accesoria a los 45 días post inseminación

Tasa de preñez con CLA a los 45 días	Tratamiento		
	PSLL	GnRH	Total
SI	50% (4/8)	77,8% (7/9)	64,7% (11/17)
NO	50% (4/8)	22,2% (2/9)	35,3% (6/17)
Total	100% (8/8)	100% (9/9)	100% (17/17)

P = 0,2316
Chi-cuadrado 1,43
gl: 1
Test: Chi-cuadrado de Pearson

4.10 Discusión

En el presente proyecto de investigación se evaluó el efecto de la administración de plasma seminal de llama y un análogo de GnRH sobre la tasa de ovulación y formación de cuerpos lúteos accesorios en vacas.

En cuanto a la obtención del plasma seminal de llama se realizó la selección de dos animales, los cuales fueron sometidos al adiestramiento de manera simultánea, en donde uno de los animales presentó facilidad de adiestramiento y un alto libido hacia el maniquí aceptando la vagina artificial, siendo este animal quien entregó las muestras de plasma seminal las que fueron colectadas durante tres meses obteniendo un total de 14 muestras. De cada eyaculado obtenido se determinó el volumen seminal y concentración de proteínas totales. El promedio para volumen seminal obtenido en el estudio es de 5,09 ml, siendo similar al valor reportado (Berland, y otros, 2016), mientras que para la concentración de proteínas totales se obtuvo 4,02 mg/ml, donde dicho valor es menor a lo publicado siendo en un rango 12 a 17 mg/ml (Tanco, Ratto, Lazzarotto, & Adams, 2011). Esto último podría deberse a problemas durante el momento de la colecta por causa de factores distractores que impiden la completa y correcta eyaculación, falta de interés por ausencia de competencia por parte de otros machos ya que este animal se encontraba solo al momento de la colecta. Se descartan problemas nutricionales ya que este macho se encontraba en buena condición corporal (3.5).

A través de la información obtenida de la cantidad de la concentración de proteínas totales de cada eyaculado se procedió a la estimación de β -NGF en el plasma seminal, donde este factor proteico forma parte en un 30% del total de proteínas presentes en el plasma seminal de llama (Kershaw-Young, Druart, Vaujhan, & Maxwell, 2012), obteniéndose 1,2 mg/ml de promedio siendo inferior al rango de 4 a 12 mg/ml de β -NGF anteriormente publicado (Tanco, Ratto, Lazzarotto, & Adams, 2011).

Una vez realizada las colectas de plasma seminal de llama y calculada las concentración de proteínas y asegurada las dosis por animal, se llevó a cabo el protocolo de sincronización para las vacas seleccionadas en este estudio en donde posterior a la inseminación artificial de estas, se procedió a realizar el seguimiento ecográfico de la primera onda folicular en fase luteal, hasta la obtención de un folículo dominante, donde dicha estructura folicular apareció en promedio al quinto día promedio post inseminación en los animales estudiados (ver tabla 2), siendo este hallazgo similar a lo encontrado en recientes estudios, demostraron también que al día

cinco post-inseminación los folículos dominantes tiene un diámetro de 9 a 10 mm, siendo una estructura folicular que a pesar de ser menor que un folículo preovulatorio en fase no luteal presenta ya receptores de LH (Martínez, Mapletof, Kastelic , & Carruthers, 2003), por esta razón el folículo dominante del quinto día post-inseminación, tiene una mejor respuesta a la inducción a la ovulación en fase luteal (Dolezel, Chambert, Musilová, & Páleník, 2017).

Después de aplicar los respectivos tratamientos (PSLL, GnRH y PBS), se determinó la tasa de ovulación en fase luteal, donde se logró obtener que animales tratados con PSLL, induce la ovulación y posterior la formación de cuerpos lúteos accesorios en un 80% (8/10) de los animales tratados, siendo un valor superior a lo publicado por Tanco (2008), donde el grupo tratado con plasma seminal de llama no indujo la ovulación en el ganado, esta diferencia podría tener respuesta en base al tipo de ganado utilizado en ambos estudios, ya en este estudio se utilizó animales de raza lechera los que estaban en producción, mientras que en el estudio de Tanco (2008), utilizaron novillas prepúberes de carne.

Por otra parte, el grupo de estudio tratado con análogo de GnRH, se logró inducir la ovulación con la posterior formación de cuerpos lúteos accesorios en un 90% (9/10) de los animales tratados, lo cual es superior a lo publicado por (Dolezel, Chambert, Musilová, & Páleník, 2017), donde reporta que animales tratados con análogo de GnRH al quinto días post inseminación, se induce la ovulación en fase luteal en un 60% y otro estudio realizado por (Jeong, Choi, Kang, Hur, & Kim, 2016), en donde la tasa de formación de un CLA es de 68,2%, dicha diferencia observada podría tener respuesta en base a las condiciones de manejo (nutricional) empleadas en este estudio, ya que las CC de los animales no decayeron durante la ejecución de esta investigación.

Se pudo observar que los tratamientos con análogo de GnRH y PSLL, tuvieron una respuesta positiva en la formación de un CLA. Sin embargo, se observó que el tratamiento en base el análogo de GnRH generó un 10% más de animales con CLA que el grupo tratado con PSLL. Estos resultados son similares a los reportados por Schmitt, y otros, (1996) , en donde se reporta un 93% de éxito en la formación de CLA en animales tratados con un análogo de GnRH.

Si bien se presentó diferencias estadísticas entre el diámetro del CL medido para CLP y CLA en el mismo grupo (Figura 9), esta diferencia podría deberse al tamaño del folículo al momento de la ovulación (Figura 5 y 6), lo cual depende del diámetro del folículo en crecimiento y la etapa del ciclo estral en la que se encuentren las estructuras ováricas, ya que se ha observado una diferencia en la dinámica de crecimiento del folículo en la fase folicular y luteal. Sin embargo, según Lynch, y otros, (2010), menciona que el diámetro del folículo al momento de la ovulación no tiene efecto sobre el tamaño final del CL, pero hay un efecto respecto a la etapa del ciclo donde toma lugar la foliculogénesis, ya que en cada etapa suceden diferentes eventos hormonales (Senger, 2003). Junto a lo anterior no hay que dejar de considerar el efecto que pudiese tener el factor inductor que media ovulación utilizado en este estudio, en donde existe un efecto de los tratamientos PSLL y análogo de GnRH, en el cual existe una vía de acción diferencial (a nivel endocrino) entre ambos tratamientos utilizados, ya que se ha descrito que el PSLL (que contiene este β -NGF) presenta por un lado una vía de acción central hipotalámica mediada por GnRH endógena (Silva, y otros, 2011), y otra vía local a través de los receptores trkA ubicada en la pared folicular (Carrasco, Singh, & Adams, 2016), mientras que el modo acción del análogo de GnRH es también a nivel central, pero solo con un efecto hipofisiario directo (Silva, y otros, 2011), si bien ambos tratamientos indujeron la formación de un CLA en un alto porcentaje de los individuos tratados, no descartamos un potencial efecto en lo que respecta al perfil de secreción de LH post tratamiento en fase luteal que pudiese responder al menor tamaño del cuerpo CLA en relación al CLP, lo anterior se basa en estudios en los cuales se ha determinado que la concentración de LH determina el diámetro del CLP (Carrasco, Singh, & Adams, 2016), lo cual fue el efecto de ambos tratamientos en lo que respecta al perfil de donde tiene una secreción significativa de LH al momento de la ovulación del folículo dominante en fase luteal y aumentado el diámetro del CLP.

En cuanto a la ubicación del CLA respecto al CLP, se observó en el presente estudio un alto porcentaje en el lado ipsilateral que llegó 94,1% (16/17) en total y en contraste con el 5,9% (1/17) obtenido para el CLA contralateral respectivamente (ver tabla 4), lo cual podría tener respuesta ya que existe un mayor flujo de sangre en el

ovario que contiene el CLP, por efecto de los procesos angiogénicos durante la formación y crecimiento del CLP, lo que significa a su vez una mayor llegada de nutrientes, oxígeno y factores hormonales en el ovario que posiblemente favorecen el crecimiento folicular observado en este estudio (Herzog , y otros, 2010).

Si bien no se observaron diferencias significativas al momento de evaluar la tasa de preñez de todos los animales del estudio (45 días post inseminación), esta similitud de los resultados podría deberse a que los animales no presentaron disminución en su CC durante el desarrollo del estudio y que el nivel de producción de estas es relativamente bajo (CC promedio 2.7, producción láctea de 8 a 15 lt/día). Por otro lado, si comparamos la tasa de preñez solo con los animales que generaron CLA, no mostraron estas diferencias estadísticas entre los tratamientos PSLL y GnRH (50% (4/8) y 77,8%(7/9)); no obstante, si comparamos solo los resultados obtenidos para el grupo GnRH con otros estudios similares, los resultados de este estudio son superiores a lo reportado por Dolezel, y otros, (2017), donde las vacas tratadas con un análogo de GnRH obtuvieron un 45% de la tasa de preñez.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se logró montar el sistema de colección de semen mediante maniquí para llamas, en donde la concentración de proteínas totales en el plasma seminal obtenido presento un promedio de 4,02 mg/ml.
- Se determinó el momento en fase luteal en el cual se logra un folículo con capacidad ovulatoria para la formación de un CLA al quinto día post inseminación.
- Los tratamientos PSSL y análogo de GnRH administrados indujeron la ovulación y posterior formación de CLA en fase luteal en los animales del estudio en un 80 y 90% respectivamente.
- Los tratamientos que indujeron la formación de un CLA permitieron la formación de una estructura luteal con características ecogénicas normales, pero de menor diámetro que el CLP ($p < 0,001$).
- No hubo diferencia en lo que respecta a tasa de preñez con generación de CLA entre los tratamientos aplicados en un 50 % para PSSL y 77,8% para análogo de GnRH.

5.2 Recomendaciones

- Utilizar el plasma seminal de llama con inductor de ovulación en fase luteal, ya que tiene similar efecto que un análogo de GnRH.
- Al realizar una colecta de semen de llama se debe tener en cuenta la temperatura y presión de la vagina artificial, ya que puede sufrir daños del aparato reproductor macho o contaminar la muestra seminal.
- Al momento de realizar un protocolo de sincronización en vacas, se debe considerar su estado reproductivo, mediante la utilización de ultrasonografía transrectal, para observar si la vaca está ciclando correctamente o tiene problemas reproductivos.

- Es importante que los animales sometidos a un tratamiento deben recibir una adecuada suplementación tanto de minerales como balanceado, para mantener o mejorar la condición corporal.

5.3 Bibliografía

- Adams, G., Ratto, M., Huanca, W., & Singh, J. (2005). Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reprod Biol Endocrin*, 3:29, 1- 5.
- Adams, G., Ratto, M., Huanca, W., & Singh, J. (2005). Ovulation-Inducing Factor in the seminal Plasma of Alpacas and Llamas. *Biology of reproduction*, 73, 452 - 457.
- Berland, M., Ulloa, C., Barría, M., Wright, H., Dissen, G., Silva, M., & Ratto , M. (2016). Seminal Plasma Induces Ovulation in Llamas in the Absence of a Copulatory Stimulus: Role of Nerve Growth Factor as an Ovulation-Inducing Factor. *Endocrinology*, 157(8):3224-32.
- Carrasco, R., Singh , J., & Adams, G. (2016). The dynamics of trkA expression in the bovine ovary are associated with a luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor (OIF/NGF). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14:47.
- Cerón, J. (2012). Fisiología clínica de la reproducción de los bovinos lecheros. En C. J., *Fisiología clínica de la reproducción de los bovinos lecheros* (págs. 20-60 páginas.). Primera edición.
- Chen, B., Yuen, Z., & Pan, G. (1985). Semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Reprod Fert*, 73, 335-339.
- Delgado, P. (2002). Biochemical components of seminal plasma of llamas (*Lama glama*) at three ages. *All Theses and Dissertations*, 5357. Obtenido de <https://scholarsarchive.byu.edu/etd/5357>
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzales, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2016). Grupo InfoStat. Obtenido de <http://www.infostat.com.ar>
- Dolezel, R., Chambert, C., Musilová, D., & Páleník, T. (2017). Induction of Accessory Corpus luteum by Gonadorelin in Relation to the Time of Treatment and the

- Follicle Size in Inseminated Cows. *Journal of Animal Science*, 62, 2017 (5): 195–200.
- Godoy, D. (2014). *Caracterización físico-química y parámetros de calidad seminal de semen de llama colectado mediante vagina artificial (Tesis de pregrado)*. Valdivia - Chile: Universidad Austral de Chile.
- Grigera, J., & Bargo, F. (2005). Termómetro de la nutrición. *Revista Infortambo*, ISSN 0328 - 4808, N° 198. P. 92 - 95.
- Gruzmacher, A. (2014). Efecto de diferentes tratamientos hormonales aplicados posterior a la inseminación artificial sobre la viabilidad embrionaria en vacas lactantes. *Tesis Master*. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Gutiérrez, J. (2008). *Hormonas de la reproducción bovina*. 515-526 páginas.
- Hernández, J. (2012). *Fisiología clínica de la reproducción de los bovinos lecheros*. Coyoacán, Mexico: Primera edición. ISBN: 978-607-00-5524-9. 20-60 páginas.
- Hernández, J., & Zarco, A. (1998). *Función del cuerpo lúteo y muerte embrionaria en rumiantes*. Departamento de Reproducción Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., & Bollwein, H. (2010). Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology*, 15;73(5):691-7.
- Intervet. (2007). *Compendium de reproducción animal*. Sinervia - Uruguay: Novena Edición.
- Jeong, J., Choi, I., Kang, H., Hur, T., & Kim, I. (2016). Effects of gonadotropin-releasing hormone administration or a controlled internal drug-releasing insert after timed artificial insemination on pregnancy rates of dairy cows. *J Vet Sci*, 17(4): 577–582.

- Kershaw-Young , C., Druart , X., Vaujhan , J., & Maxwell, W. (2012). β -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reprod Fertil Dev*, 24(8):1093-7.10.1071/RD12039.
- Lynch , C., Kenny , D., Childs , S., & Diskin , M. (2010). The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. *Theriogenology*, 15;73(2):190-8.
- Martínez, M., Mapletof, R., Kastelic , J., & Carruthers, T. (2003). The effects of 3 gonadorelin products on luteinizing hormone release, ovulation, and follicular wave emergence in cattle. *Can Vet J*, 44(2): 125–131.
- Niño, M. (2010). Determinación de la presencia de un factor de ovulación en el plasma seminal de conejo. *Tesis Master*, Valdivia - Chile.
- Ratto, M., Huanca, W., & Adams, G. (2010). Ovulation-inducing factor: a protein component of llama seminal plasma. *Reprod Biol Endocrin*, 8:44, 1-7.
- Ratto, M., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. (2006). Comparison of the effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of llamas, alpacas, and bulls. *Theriogenology*, 66, 1102-1106.
- Rivadeneira, V. (2013). *Ciclo estral Bovino*. Facultad de Medicina Veterinaria. Sirivs.
- Rocha, D., & Saavedra, V. (2005). *Manual de adiestramiento de llamas*. Obtenido de www.condoririuto.edu.bo/MANUALDEADIESTRAMIENTODELLAMAS.pdf.
- Rodríguez, J. (2003). Efecto de la sincronización estral con un progestágeno y del método de sincronización de la ovulación sobre la tasa de preñez en ganado de doble propósito, en finca San Julián. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de San Carlos de Guatemala , Guatemala.
- Schmitt , E., Diaz, T., Barros, C., de la Sota, R., Drost , M., Fredriksson, E., . . . Thatcher, W. (1996). Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic

gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J Anim Sci*, 74(5):1074-83.

Senger, P. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. Pullman, Washington, USA: Cadmus Professional Communications.

Silva, M. (2012). Caracterización funcional del factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal de llama. *Tesis Master*, Valdivia-Chile.

Silva, M., Smulders, J., Gue, M., Valderrama, X., Letelier, C., & Adams, G. (2011). Cetrorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9:74.

Sintex. (2005). Fisiología Reproductiva del Bovino. Laboratorio de Especialidades Veterinarias.

Soria, C. (2012). Facultad de Medicina Veterinaria, Cuenca.

Tanco, V. (2008). Biological characterization of ovulation-inducing factor (OIF) en llama seminal plasma. *Tesis Master of Science*, Departament of Veterinary Biomedical Sciences, University of Saskatchewan, Canadá.

Tanco, V., Ratto, M., Lazzarotto, M., & Adams, G. (2011). Dose-Response of Female Llamas to Ovulation-Inducing Factor from Seminal Plasma. *Biology of Reproduction*, 85, 452-456.

Vargas, J. (2012). Efecto de la administración intravaginal de plasma seminal de llama (lama glama) y toro (*Bos taurus*) sobre la dinámica folicular y luteal en vacas holstein friesland previamente sincronizadas con progesterona. Universidad Austral de Chile., Facultad Ciencias Veterinarias, Valdivia-Chile.