

NIVELES DE PROGESTERONA PERIFERICA EN ALPACAS Y LLAMAS Y SU APLICACION EN EL DIAGNOSTICO PRECOZ DE GESTACION Y OTROS USOS CLINICOS

Sumar J., Alarcón V. y Echevarría L.

Centro de Investigación IVITA
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Apartado 1843, Lima-Perú

RESUMEN. Se estudiaron los niveles de progesterona periférica (P4) después del servicio fértil, en 12 alpacas y 12 llamas en celo y con cría al pie. Fueron servidas por una sola vez con machos fértiles y por un período de 20 minutos. Se tomó una muestra diaria de sangre yugular los días 1 (día del servicio), 5, del 8 al 20, 25 y 30 post-servicio. Se separó el plasma por centrifugación y se congeló a -20°C hasta su análisis, por la técnica de radioinmunoensayo de Fase Sólida. Todas las alpacas y 10 llamas ovularon y desarrollaron un cuerpo lúteo, que se observó al 3er día post-servicio, por laparoscopia. Los niveles de P4 el día 1 del estudio (celo y servicio) fueron de 0.32 y 0.53 nmol/L en alpacas y llamas respectivamente. Seguidamente, los niveles de P4 se incrementaron hasta el día 8 en alpacas no preñadas (12.03 nmol/L) y hasta el día 9 en llamas no preñadas (14.10 nmol/L). Más adelante se observó una caída rápida de la P4 circulante, hasta niveles basales en los días 10 y 11 post-servicio en alpacas y llamas respectivamente ($P < 0.001$). Los niveles de P4 en alpacas preñadas se mantuvieron altos después del día 8 hasta el día 30 post-servicio, en que se condujo el presente estudio, fluctuando entre 12.32 y 17.36 nmol/L. En llamas preñadas, las concentraciones de P4 siguen el mismo perfil que en alpacas preñadas, aunque con niveles más altos, fluctuando entre 17.51 y 24.66 nmol/L. En las dos llamas que presentaron falla de ovulación, los niveles de P4 se mantuvieron basales. En este estudio, el nivel mínimo de P4 para un diagnóstico positivo de gestación, entre 9 y 30 días post-servicio, fué de 4.0 nmol/L (1.25 ng/ml) en ambas especies. El diagnóstico precoz de gestación, mediante la determinación de la progesterona periférica, puede llevarse a cabo a partir del día 12 post-servicio. Aquellas alpacas o llamas que mostraron bajos niveles de P4 después de la ovulación (día 8 o 9), fueron susceptibles a perder el embrión muy tempranamente, por insuficiencia luteal. Niveles basales de P4 el día 4to. post-servicio, indicarían falla de ovulación.

INTRODUCCION

La Alpaca y la Llama constituyen los mamíferos domésticos indígenas del Perú de gran importancia socio-económica, para miles de familias que habitan las grandes alturas de la Cordillera de los Andes, donde las condiciones climáticas permiten solamente una limitada agricultura circunscrita a ciertos ecoclimas, y donde la crianza de camélidos sudamericanos domésticos, constituye la

SUMMARY. Post-mating progesterone (P4) profiles in alpaca and llama females were measured in serum by radioimmunoassay (RIA). Twelve alpacas and 12 llamas in oestrous, with calf at foot, were mounted in one occasion by a fertile male for a minimum period of 20 minutes. Blood samples were collected on day 1 (day of mating), daily from 8 to 20, and at days 25 and 30 post-mating. Plasma was stored at -20°C until assayed for P4 by RIA-Solid Phase. All alpacas and 10 llamas ovulated and developed an active corpus luteum observed through laparoscopy. The P4 level on day 1 were 0.32 and 0.53 nmol/L in alpacas and llamas respectively. The levels of P4 subsequently increased until day 8 in non-pregnant llamas (14.10 nmol/L). Thereafter, there was a rapid decline and reached basal levels on days 10 and 11 post-mating in alpacas and llamas, respectively ($P < 0.001$). The P4 concentration in pregnant alpacas was kept high after day 8 post-service until day 30 of the present study, fluctuating between 12.32 and 17.36 nmol/L. In pregnant llamas, the P4 concentration follow the same pattern than in alpacas, although at higher values, ranging between 17.51 and 24.66 nmol/L. Basal levels of P4 were maintained in the two llamas that failed to ovulate. In this study, the minimum levels of P4 for positive pregnancy diagnosis, between 9 and 30 days post-mating was 4.0 nmol/L (1.25 ng/ml), in both species. An early pregnancy diagnosis in both alpacas and llamas can be obtained through progesterone determination since day 12 post-service. Females alpacas and llamas showing low levels of P4 after ovulation (at day 8 or 9), are prone to present very early embryo death, triggered by luteal insufficiency. Basal levels of P4 after day 4 post-mating will indicate ovulation failure.

alternativa más viable, estable y rentable para los habitantes de esas regiones (Thomas, 1973; Sumar, 1988a). A pesar de su gran utilidad al hombre, la crianza y manejo de estas especies ha sido muy pobre y se ha prestado poca atención a su mejoramiento integral.

Reproductivamente los camélidos sudamericanos domésticos, son notoriamente diferentes a otras especies de rumiantes, lo que en parte explica las bajas tasas de fertilidad de

la especie, cuando son manejados con prácticas reproductivas apropiadas para otras especies animales, como los ovinos, por ejemplo. Sin embargo, en los últimos 20 años, el conocimiento de la fisiología y comportamiento sexual, han avanzado notoriamente (Fernández Baca, 1971; Novoa y col., 1973; Sumar, 1977, 1983, 1988a).

Para tener un conocimiento satisfactorio de los complejos eventos fisiológicos y endocrinos que ocurren durante las funciones reproductivas normales y patológicas, se requiere la cuantificación de las hormonas específicas que están involucradas. El desarrollo de la Técnica de Radioinmunoensayo (RIA) para el análisis de hormonas en los animales domésticos, ha sido uno de los más importantes adelantos de los últimos tiempos (Stabenfeldt y col., 1976), haciendo posible medir los niveles hormonales en pequeñas cantidades de sangre, leche u otros fluidos corporales; más aún, la determinación de las concentraciones a intervalos cortos, permite penetrar y conocer fácilmente los patrones de la dinámica secretoria hormonal de las glándulas endocrinas.

En la vaca, así como en una gran mayoría de animales, la presencia del cuerpo lúteo, es necesaria para el mantenimiento de la preñez (Edqvist y col., 1973; Stabenfeldt y Edqvist, 1984), así como también en la alpaca y la llama (Sumar, 1988). El principio básico para determinar la gestación, es verificar la actividad lútea, cuantificando la hormona progesterona (P4), ya sea en la sangre (suero o plasma) o en la leche. Así por ejemplo, en la vaca, los niveles de P4 son diferentes significativamente entre las hembras preñadas y no preñadas, cerca del día 19 o 20 después del servicio. La posibilidad de diferenciar tempranamente entre los animales preñados y no preñados, existe también en otras especies de animales (Stabenfeldt y Edqvist, 1984).

Así mismo, se han medido los niveles de P4 en el plasma sanguíneo y en la leche de alpacas y llamas lactantes, después del servicio estéril (Sumar y col., 1988; Sumar y García, 1985). La P4 comenzó a incrementarse entre el 4to y 5to día después del servicio, para llegar a los mayores niveles, entre los días 7 y 8, declinar rápidamente y desaparecer entre los

días 10 y 11 post-servicio. En un ensayo preliminar en alpacas lactantes, servidas con macho fértil, usando muestras de leche, se encontró que las preñadas tenían en promedio 20.75 nmol/L al onceavo día, mientras que para el mismo día en las vacías o no preñadas, los niveles eran basales (Sumar y García, 1985a).

Este estudio se llevó a cabo con la finalidad de cuantificar la P4 circulante durante los primeros 30 días post-servicio en las hembras servidas con macho fértil, así como estudiar su uso clínico en las fallas de ovulación, fallas de fertilización y mortalidad embrionaria temprana.

MATERIAL Y METODOS

Animales

De un rebaño de alpacas y llamas en parición, proveniente de la Estación Principal de Altura de la "La Raya" (IVITA-UNMSM), localizada a 175 km al sur de la ciudad del Cusco y a una altitud de 4250 metros; se escogieron 12 alpacas y 12 llamas adultas con cría al pie y receptivas al macho. El peso promedio de las alpacas fue de 58.5 kg y 92.0 kg en llamas, con 17 días de post-partum como mínimo en ambas especies, tiempo mayor al período post-parto recomendado para obtener niveles de fertilidad apropiados (Sumar y col., 1972). Antes y después del experimento, los animales fueron mantenidos en las condiciones usuales de manejo y alimentación, en pasturas naturales. Todas las hembras fueron identificadas, además del arete en la oreja, con un collar de plástico numerado y de un color para cada especie.

Selección de hembras receptivas o en celo y servicios

Las hembras en celo de ambas especies, provenían de rebaños aislados de machos desde el empadre anterior, es decir 11 meses como mínimo. Para detectar las hembras en celo, éstas se enfrentaron a machos vasectomizados. Solamente aquellas hembras que adoptaban rápidamente la posición de cópula, sentándose ante la aproximación y monta del macho, fueron seleccionadas para el experimento. El mismo día que se escogieron

en celo, se inició el experimento (Día 1), con la primera muestra de sangre antes del servicio con macho fértil; todo esto se hizo en un sólo día y en una sola hora, para evitar cualquier influencia de los machos vasectomizados, sobre la inducción de la ovulación sin monta, tal como ha sido reportado por Fernández Baca, (1970) y Leyva y Sumar, (1982). Las hembras en celo fueron servidas una sola vez con machos fértiles y por un tiempo entre 20 y 30 minutos.

Toma de muestras de sangre

Diariamente se tomaron aproximadamente 10 ml de sangre por punción yugular en tubos heparinizados, los días 1 (día del servicio), 5, del 8 al 20 y finalmente los días 25 y 30 post-servicio. Las muestras fueron inmediatamente centrifugadas a 3,000 r.p.m. por 10 minutos, separando el plasma en tubos de poliestireno y congelándolos a -20°C hasta su análisis en el laboratorio.

Verificación de la ovulación y formación de cuerpo lúteo

La ovulación y formación de cuerpo lúteo, se verificó al tercer día post-servicio, por el método de laparoscopia, descrito por Sumar y Bravo, (1991). Se hizo un registro minucioso de todas las estructuras ováricas y anexas, así como un diagrama de posición de las estructuras en el ovario y se tomó fotografías laparoscópicas.

Control de celo o receptividad

Se controló el celo o receptividad de las alpacas y llamas del estudio, al 12 y 25 día post-servicio, usando machos vasectomizados y observando la conducta sexual de ambos sexos (Fernández Baca, 1970).

Análisis de progesterona

El análisis de la concentración de P4 en el plasma sanguíneo circulante, se hizo utilizando kits comerciales de radioinmunoensayo (RIA) en Fase Sólida, fabricados y abastecidos por el laboratorio de Siebersdorf, Austria, pertenecientes a la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA). Este método ha sido empleado en otros países y en diversas especies animales, con resultados satisfactorios

(García, 1982; Laitinen y col., 1985; Nachreiner y col., 1986); así como también por Sumar y García (1987) en plasma y leche de alpacas y llamas. En la técnica de RIA-Fase Sólida, a diferencia de otras técnicas, los anticuerpos están inmovilizados en las paredes de un tubo de prueba y utiliza el yodo 125 como trazador. Los análisis se hicieron por duplicado y se expresaron en nanomoles por litro (nmol/L).

Análisis estadístico

Todos los valores fueron transformados logarítmicamente y los promedios, desviaciones estándar y errores estándar de la media, fueron calculados desde el primer día, hasta el día 30 post-servicio, en hembras preñadas, como en las que volvieron en celo, siendo estadísticamente analizados, por el método de ANOVA, sugerido por Snedecor y Cochran (1974).

RESULTADOS

Los cambios en la concentración de P4 periférica en 5 alpacas y 6 llamas, que quedaron preñadas hasta los 30 días post-servicio, se muestran en la Tabla 1. El día que las hembras fueron detectadas en celo (Día 1) y servidas con macho fértil, tenían 0.32 y 0.53 nmol/L en alpacas y llamas respectivamente, niveles considerados basales. Hacia el 5 día post-servicio, los niveles de P4 se incrementan moderadamente, hasta 2.46 y 1.93 nmol/L en alpacas y llamas respectivamente. Para el día 8 post-servicio, los niveles alcanzan concentraciones de 18.5 y 16.4 nmol/L en alpacas y llamas respectivamente. En alpacas en el período crítico que corresponde a los días 9, 10 y 11, se produce una ligera caída en los niveles de P4, para luego el 12 día subir a niveles de 16.0 nmol/L. De igual forma, en las llamas, los niveles de P4 continúan creciendo hasta niveles de 25.13 nmol/L en el 11 día y de allí hasta el día 30 los niveles variaron de 17.51 a 24.66 nmol/L.

Todas las hembras, alpacas y llamas, ovularon formando un cuerpo lúteo activo, tal como se observó laparoscópicamente al 3er día post-servicio, presentando una actitud de rechazo al macho los días 12 y 25 post-servicio. Como se podrá observar en la Tabla

Tabla 1. Promedios, mínimos y máximos niveles de Progesterona (nmol/L) en 5 Alpacas y 6 Llamas que resultaron preñadas

Día	ALPACAS			LLAMAS		
	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo
1	0.32	0.1	0.6	0.53	0.5	0.6
5	2.46	1.2	5.1	1.93	1.2	3.5
8	18.50	9.3	33.1	16.41	8.0	33.8
9	16.34	10.4	22.9	17.81	15.5	20.5
10	13.70	9.6	22.9	20.70	13.0	44.2
11	12.84	6.8	20.3	25.13	13.0	64.4
12	16.00	11.9	21.6	23.28	14.5	47.5
13	17.36	12.4	21.5	20.55	7.7	53.8
14	16.94	11.0	24.2	22.78	9.9	49.0
15	12.32	8.9	17.0	24.66	12.3	62.9
16	14.46	9.1	21.6	18.23	10.5	40.9
17	15.38	9.7	27.3	22.38	9.5	60.0
18	12.74	8.1	16.0	18.01	10.2	35.3
19	16.60	8.5	24.1	18.66	10.9	37.8
20	16.70	8.0	23.0	17.51	9.3	32.0
25	13.00	10.6	14.2	20.48	9.3	49.8
30	14.06	11.6	17.8	18.38	9.2	33.0

Tabla 2. Promedios, mínimos y máximos niveles de Progesterona (nmol/L) en 7 Alpacas y 4 Llamas que fallaron en la Fertilización o perdieron precozmente el Embrión

Día	ALPACAS			LLAMAS		
	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	Máximo
1	0.38	0.1	0.7	0.45	0.3	0.6
5	1.46	0.9	1.8	1.38	0.7	1.8
8	12.03	9.6	14.5	10.90	6.5	12.1
9	3.2	1.0	4.6	14.10	10.1	17.2
10	0.76	0.3	1.1	6.90	4.4	8.8
11	-	-	0.8	2.90	1.2	3.4
12	-	-	-	0.28	0.1	0.4

1, los cambios en los niveles de P4 en las hembras preñadas de ambas especies, son similares, aunque en las llamas, las concentraciones de P4 son mayores; así mismo, se observa una gran variación entre individuos de la misma especie. El nivel mínimo compatible con gestación en el presente ensayo, fué de 4.0 nmol/L (1.25 ng/ml).

La Tabla 2 nos muestra los niveles de P4 en las siete alpacas y 4 llamas que ovularon de acuerdo a las observaciones laparoscópicas y al

incremento de los niveles periféricos de P4, pero que el día 12 post-servicio, mostraron celo o receptividad al macho, habiéndose producido falla en la fertilización o muerte embrionaria muy temprana, estando por lo tanto vacías. En estas hembras los niveles de P4 el día del celo y servicio no difieren absolutamente de aquellas hembras que quedaron preñadas. Hacia el quinto día los niveles de P4 llegan a 1.46 y 1.38 nmol/L en alpacas y llamas respectivamente, niveles más bajos de las que quedaron preñadas, aunque no estadísticamente significativos. Al octavo día

los niveles fueron de 12.03 y 10.9 nmol/L en alpacas y llamas respectivamente, diferentes significativamente ($P < 0.05$) a los niveles de las hembras preñadas. Para el día 20 los niveles de P4 fueron de 0.76 y 6.90 nmol/L en alpacas y llamas respectivamente, diferente significativamente ($P < 0.01$) a los niveles que se observan en las preñadas, para el mismo día. A partir del 12° día y hasta el 30° día, los niveles de P4 en ambas especies, se mantuvieron basales, variando desde indetectables a 0.83 nmol/L.

En las dos llamas que no ovularon, los niveles de P4 el día del celo y servicio, fueron de 0.5 y 0.4 nmol/L y se mantuvieron en el nivel basal hasta el 30 día, mostrando celo los días 12 y 25 post-servicio.

DISCUSION

A partir del día 12 post-servicio en alpacas y llamas, hay una marcada diferencia entre aquellas hembras que quedaron preñadas, de aquellas que, o tuvieron fallas de fertilización o perdieron el embrión muy prematuramente. La Fig. 1 nos muestra el comportamiento de la P4 periférica en alpacas y llamas gestante y no gestantes o vacías. Al doceavo día post-servicio, los niveles de P4 fueron de 16.0 y 25.13 nmol/L en alpacas y llamas gestantes respectivamente, comparados con 0.76 y 0.28 nmol/L en aquellas que volvieron en celo y estaban "vacías", diferencia ésta que sirve a los efectos de un diagnóstico precoz de gestación en los camélidos sudamericanos domésticos.

Estos resultados, concuerdan con los niveles de progesterona reportados preliminarmente por Sumar y García (1985) en leche de alpacas gestantes. Por el contrario, difieren de los resultados de Huie y Foote (1985) de la Universidad de Utah-USA, en llamas gestantes, quienes indican que los niveles de P4 durante las tres primeras semanas fué bajo, variando de 0.08 ± 0.03 a 1.24 ± 0.61 ng/ml, o lo que es lo mismo, entre 0.25 a 3.94 nmol/L. La explicación a esta diferencia de resultados, puede deberse a que en el caso de USA, las muestras de sangre fueron enviadas por correo, donde pudo malograrse la muestra, o al sistema de toma de muestras de sangre por cada uno de los dueños de llamas, además de que los autores interpolaron los resultados

de acuerdo a la fecha de parto indicada por los dueños, procedimiento éste que ha podido interferir con los resultados, por la variación normal en el largo de la gestación. En el caso nuestro, el tiempo de gestación se calculó en función a la fecha de servicio en un solo día y todo el sistema estuvo estandarizado, desde la colección, centrifugado, congelamiento y procesamiento en laboratorio.

Las concentraciones de P4 plasmática en la vaca a los 21 días post-servicio, fluctúan entre 19.1 y 25.5 nmol/L, comparados a 1.6 nmol/L o menos en animales no gestantes, en el mismo día (Edqvist y Stanbenfeldt, 1980). El mismo principio básico ha sido aplicado en la borrega y cerda (Robertson y Sarda, 1971), en el búfalo de agua (Nanda y col., 1984) y en el camello árabe (Argawal y col., 1987).

Sin embargo, los estudios de Fernández Baca, (1970) y los de Bravo y Sumar, (1985), señalan una muerte embrionaria alta, hasta los 60 días post-servicio, por lo que lo recomendable sería un nuevo análisis de P4 posterior al día 60, a fin de confirmar la gestación o la muerte embrionaria o fetal. Este fenómeno también se presenta en otras especies de animales domésticos.

Cabe destacar la interesante observación de este estudio, de que las alpacas y llamas, que perdieron prematuramente el embrión, mostraron niveles de P4 significativamente bajos el día 8 post-servicio (Tabla 2) comparados con los mayores niveles de aquellas que quedaron preñadas hasta el día 30 (Tabla 1); éstas hembras muestran una función luteal insuficiente, que condicionaría la muerte embrionaria precoz. Se requiere, de un mayor número de animales para determinar la veracidad de estos resultados preliminares. Así mismo, es interesante notar que aquellas dos llamas que no ovularon, mantuvieron niveles basales de P4, corroborando la falta de función luteal.

Los análisis de concentración de P4 en el plasma sanguíneo y usando los kits de la OIEA, han probado ser confiables y eficientes y no requieren de equipo costoso y sofisticado.

Finalmente la determinación de P4 en camélidos domésticos es definitivamente una prueba muy útil para fines de diagnóstico

precoz de la gestación, así como para el pronóstico de deficiencias de la función luteal, fallas de ovulación y muerte embrionaria y fetal.

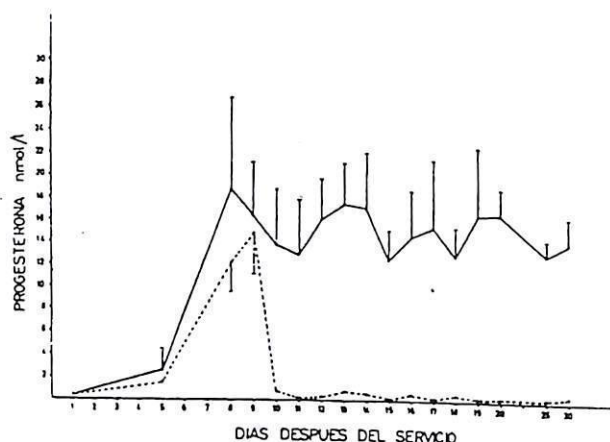


Figura 1. Niveles de progesterona periférica promedios (\pm ESM), en alpacas preñadas (-) y en las que fallaron en fertilizar o tuvieron muerte embrionaria muy temprana (...).

REFERENCIAS

- Agarwal S.P., Khanna N.D., Agarwal V.K., Dwaraknath P.K. (1987) Circulating levels of estrogens and progesterone in female camel (*Camelus dromedarius*) During Pregnancy. *Theriogenology*, Vol. 28, No.6.
- Bravo W. y Sumar J. (1985) Factores que determinan la fertilidad en alpacas. Libro de resúmenes. V Convención Int. sobre camélidos sudamericanos. IVITA de la Univ.Nac.Mayor de San Marcos y Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Univ. San Antonio Abad del Cusco. 16 - 21 de Junio, Cusco-Perú.
- Edqvist L.E., Stanbenfeldt G.H. (1980) Reproductive Hormones. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animal*. 3 Ed. Academic Press.
- Edqvist L.E., Ekman L., Gustafsson B., Johansson E.D.B. (1973) Peripheral plasma levels of oestrogens and progesterone during the bovine pregnancy. *Acta Endocrinol (Kbh)*, 72:81-88.
- Fernández-Baca S. (1970) Luteal Function and the Nature of Reproductive Failures in the Alpaca. Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, New York.
- Fernández-Baca S. (1971) La alpaca, reproducción y crianza. Boletín de divulgación No.7. Centro de Investigación Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA): Univ. Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Fernández-Baca S. Madden D.H.L., Novoa C. (1970) Effect of different Mating Stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J.Reprod.Fert.* 22, 261-267.
- García, M. (1982) Post-partum. Reproductive functions in dairy cows. M.Sc. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Huie M. y Foote W.C. (1985) Niveles de progesterona durante la gestación y su aplicación en el diagnóstico de preñez en llamas. Libro de Resúmenes. V Convención Int. Sobre camélidos sudamericanos. IVITA de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Univ.Nac. San Antonio Abad del Cusco. 16-21 de Junio, Cusco-Perú.
- Laitinen J., Remes E., Tenhunen M., Hanninen O., Alanko M. (1985) Milk Progesterone in Finnish Dairy Cows: A field study on the control of artificial insemination and early pregnancy. *Br.Vet.J.* 141:297-307.
- Leyva V. y Sumar J. (1982) Determinación del patrón anual de presentación de celos y ovulación espontánea en alpacas. En: *Investigaciones en camélidos sudamericanos y ovinos. Programa colaborativo de investigación en rumiantes menores. Título XII-AID. Centro de Investigación IVITA, Univ.Nac. Mayor de San Marcos. Período 1980-1984.*
- Nachreiner R.F., Oschmsnn S.J., Edqvist L.E. y Richards J.I. (1986) Solid-phase radioimmunoassay (RIA) appropriate for use in developing countries. In: *Nuclear and related techniques in animal reproduction and health. IAEA, Vienna.* pp.653-659.
- Nanda A.S., Takkar O.P. y Shanna R.D. (1984) Serum progesterone levels as an index of pregnancy in buffaloes. *Animal Reproduction Science* 7, 447-450.
- Novoa C., Sumar J., Leyva V. y Fernández-Baca S. (1973) Incremento reproductivo en alpacas de explotaciones comerciales mediante el método del empadre alternado. *Rev.Inv.Pec. (IVITA) Univ.Nac. Mayor de San Marcos*, 2(2):191-193, Julio-Diciembre.
- Robertson H.A. y Sarda I.R. (1971) A very early pregnancy test for mammals: its application to the cow, ewe and sow. *J.Endocrinol.* 49:407-419.
- Snedecor G.H. y Cochran W.G. (1974) *Statistical methods*. 6th edition. Academic Press, Ames, Iowa.
- Stanbenfeldt G.H. y Edqvist L.E. (1984) Female reproductive processes. Chapter 49. En: *Dukes Physiology of domestic animals*. pp.798-832.
- Stanbenfeldt G.H., Kindahl, H. and Edqvist L.E. (1976) Radioisotopic techniques for the study of reproductive physiology in domestic animals: 2 physiological implications. In: *Nuclear techniques in animal production and health*. pp.525. IAEA, Vienna.
- Sumar J. (1977) Algunos índices de productividad en la llama Anales de la I reunión de la Asociación Peruana de Producción Animal (APPA) y I Simposio sobre producción de leche en el País pp.31-32.

Sumar J. (1983) Studies on reproductive pathology in alpacas. M.Vsc. Thesis. Swedish university of agricultural sciences. Uppsala, Sweden.

Sumar J. (1988) Removal of the ovaries or abrasion of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 83:133-141.

Sumar J. y Bravo W. (1991) Insitu observation of the ovaries of llamas and alpacas by use of a laparoscopic technique. *JAVMA*, 199, 1159-1163.

Sumar J. y García M. (1985) Niveles de progesterona en la leche de alpacas después del servicio estéril. Libro de resúmenes. V Convención int. sobre camélidos sudamericanos. IVITA de la Univ.Nac. Mayor de San Marcos y Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Univ.Nac. San Antonio Abad del Cusco. 16-21 de Junio, Cusco-Perú.

Sumar J. y García M. (1987) Progesterone levels in

alpacas after sterile mating by the phase-solid technique. Seminario destinado a la América Latina para mejorar la eficacia reproductiva y la sanidad del ganado por medio del radioinmunoensayo y de técnicas conexas. Caracas, Venezuela 2-6 de Marzo. OIEA, Vienna.

Sumar J., Novoa C. y Fernández-Baca S. (1972) Fisiología reproductiva post-partum en la alpaca. *Rev.Inv.Pec. (IVITA) Univ.Nac. Mayor de San Marcos* 1(1):21-27, Enero-Junio.

Sumar J., Fredicksson G., Alarcón V., Kindshl H. y Edqvist L.E. (1988) Levels of 15-keto-13, 14-dihydro-PGF₂alpha, progesterone and oestradiol-17beta after ovulation in llamas and alpacas, *Acta Vet.Scand.* 29:339-346.

Thomas R.B. (1973) Human adaptation to a high andean energy flow system. Occasional paper in anthropology, Pennsylvania State University, University Park