



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

NIVELES SÉRICOS DE IL-10 Y
REABSORCIÓN EMBRIONARIA EN
Vicugna pacos DURANTE EL PRIMER MES
DE GESTACIÓN

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN INMUNOLOGÍA

HELEN ROSSANNA DELLEPIANE GIL

LIMA-PERÚ

2025

ASESOR

Mg. JOSE LUIS ROJAS VILCA

CO-ASESOR

Mg. SIEVER MIGUEL MORALES CAUTÍ

JURADO DE TESIS

DR. IVAN BEST CUBA

PRESIDENTE

MG. MILAGROS PINTO DIAZ

VOCAL

MG. MARCO CABELLO NAPURI

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A mi familia por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS.

A mis asesores, por su apoyo en la elaboración del manuscrito Dr. Jose Luis Rojas y a mi asesor externo Mg. Siever Morales Cautí.

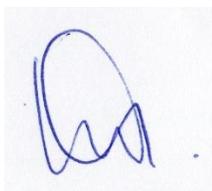
Al Laboratorio de Reproducción animal de la UNMSM.

A mis amigos y colegas del laboratorio de Reproducción animal, especialmente al estimado Dr. Huanca por su acompañamiento y asesoramiento en la ejecución del presente trabajo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis autofinanciada.

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	26	SETIEMBRE	2024
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	DELLEPIANE GIL HELEN ROSSANNA		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN INMUNOLOGÍA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2016		
TITULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	"NIVELES SÉRICOS DE IL-10 Y REABSORCIÓN EMBRIONARIA EN Vicugna pacos DURANTE EL PRIMER MES DE GESTACIÓN"		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	Tesis		
Declaración del Autor			
El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	940282441		
E-mail	helen.dellepiane@upch.pe		



Firma del egresado

DNI 47115761

Contenido

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. MARCO TEÓRICO.....	4
IV. METODOLOGÍA	26
V. RESULTADOS.....	36
VI. DISCUSIÓN	47
VII. CONCLUSIONES.....	57
VIII. RECOMENDACIONES.....	59
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	60

ABREVIATURAS:

IL-10	: Interleuquina 10
P4	: Progesterona
CSA	: Camélidos sudamericanos
CL	: Cuerpo lúteo
PGF2α	: Prostaglandina F2 alfa
DC	: Célula dendrítica
LTH1	: Linfocito T helper 1
LNK	: Linfocito Natural killer
INF-t	: Interferón Tau
PMN	: polimorfonucleares

Resumen

Citoquinas como la IL-10 están relacionadas con la tolerancia inmunológica materna e involucrada con la sobrevivencia embrionaria. Por otro lado, las alpacas (*Vicugna pacos*) son de gran importancia económica de las familias altoandinas; sin embargo, presentan altas tasas de pérdidas embrionarias durante el primer mes de gestación. Por ello, el objetivo del estudio fue, explorar la asociación entre los niveles séricos de interleuquina-10 (IL-10) y la reabsorción embrionaria en alpacas durante el primer mes de gestación. Se evaluó en suero sanguíneo los niveles de IL-10 y progesterona (P4) en alpacas de raza Huacaya (n=10) los días 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 post – apareamiento. Para evaluar el resultado post-apareamiento, se hizo la prueba de rechazo al macho los días 15 y 18; y se realizaron ecografías transrectales los días 21, 24, 27 y 30 para evaluar la gestación. La IL-10 fue medida por la técnica de ELISA, y la P4 por RIA. Los datos fueron analizados con el programa estadístico R y comparación de medianas con Kruskal-Wallis para perfiles de IL-10 y P4. Adicionalmente se aplicó la prueba de coeficiente de correlación de Spearman entre la P4 e IL-10. Las alpacas hembra se agruparon según el resultado del apareamiento, G1: hembras preñadas; G2: hembras que reabsorbieron el embrión; G3: hembras que no quedaron preñadas. Los niveles de IL-10 no presentaron diferencia entre los grupos G1, G2, y G3 en los días evaluados (0, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30) ($p > 0.05$); sin embargo, se observó que los niveles de IL-10 de las alpacas preñadas fueron superiores a las que reabsorbieron el embrión en los días evaluados. Sobre los niveles de progesterona, se observó diferencias entre el G1 y G2 al Día 0 ($p < 0.05$), así como en

los días 15 y 18 entre el G1 y G3 ($p < 0.05$), y entre el G2 y G3 ($p < 0.05$); y también en los días 21, 24, 27 y 30 hubo diferencias entre G1 y G3 ($p < 0.05$). Además, se observó una correlación positiva no lineal ($p < 0.001$) entre los niveles de IL-10 y P4 en alpacas. Existiendo indicios de una posible asociación entre los niveles séricos de IL-10 y la reabsorción embrionaria en alpacas durante primer mes de gestación.

Palabras Clave: alpacas, reabsorción embrionaria, Interleuquina-10

Abstract

Cytokines such as IL-10 are related to maternal immune tolerance and are involved in embryonic survival. On the other hand, alpacas (*Vicugna pacos*) are of great economic importance to high-Andean families; however, they present high rates of embryonic loss during the first month of gestation. Therefore, the objective of this study was to explore the association between serum interleukin-10 (IL-10) levels and embryonic resorption in alpacas during the first month of gestation. IL-10 and progesterone (P4) levels were measured in the blood serum of Huacaya alpacas (n=10) on days 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27, and 30 post-mating. To assess the post-mating outcome, male rejection tests were performed on days 15 and 18, and transrectal ultrasounds were performed on days 21, 24, 27, and 30 to evaluate gestation. IL-10 was measured using the ELISA technique, and P4 by RIA. Data were analyzed with the R statistical program, and median comparisons were made using the Kruskal-Wallis test for IL-10 and P4 profiles. Additionally, the Spearman correlation coefficient test was applied between P4 and IL-10. They were grouped according to the mating outcome: G1: pregnant females; G2: females that reabsorbed the embryo; G3: females that did not become pregnant. IL-10 levels did not differ between groups G1, G2, and G3 on the days evaluated (0, 12, 15, 18, 21, 24, 27, and 30) ($p>0.05$); however, it was found that IL-10 levels in pregnant alpacas were higher than in those that reabsorbed the embryo on the days evaluated. Regarding progesterone levels, differences were observed between G1 and G2 on Day 0 ($p<0.05$), as well as on days 15 and 18 between G1 and G3 ($p<0.05$), and between G2 and G3 ($p<0.05$); and also on days 21, 24, 27, and 30, there

were differences between G1 and G3 ($p < 0.05$). In addition, a positive non-linear evaluation ($p < 0.001$) was observed between IL-10 and P4 levels in alpacas. There is evidence of a possible association between serum IL-10 levels and embryonic resorption in alpacas during the first month of gestation.

Keywords: alpacas, embryonic resorption, Interleukin-10

I. Introducción

Los camélidos sudamericanos domésticos como las alpacas (*Vicugna pacos*) forman parte de nuestra cultura andina desde hace miles de años, la cual cuenta con 3´685,516 animales (1). Los productores de camélidos sudamericanos (CSA), manejan la reproducción de sus animales a través del servicio de apareamiento controlado para asegurar el mayor número de hembras preñadas, así obteniendo más crías, que permita la renovación y mejora del rebaño (2). Sin embargo, las alpacas tienen una pobre eficiencia reproductiva, siendo la sobrevivencia embrionaria del 50% en el primer mes de gestación (3). Esta alta incidencia en cuanto a la mortalidad embrionaria en alpacas, produce una baja tasa reproductiva en esta especie; siendo el periodo más crítico el primer mes de gestación(3), o incluso hasta los primeros 45 a 60 días de gestación (4). Y así mismo, estas pérdidas embrionarias tempranas conllevan a su vez a pérdidas económicas (5).

Durante la implantación existe una comunicación entre el feto y la madre, la cual esta modulada por variables inmunológicas, endocrinas y moleculares. La ausencia de inmunotolerancia durante la gestación puede traer problemas como el rechazo al embrión (6). Además, la inflamación aberrante y persistente, y la ausencia de la resolución por células productoras de citoquinas antiinflamatorias pueden conllevar a una variedad de desórdenes reproductivos (7).

En humanos, el éxito de la implantación embrionaria está relacionado con la expresión de citoquinas y células del sistema inmunológico (8). Las citoquinas son proteínas que participan en el mantenimiento del cuerpo lúteo cíclico, adhesión fetal e invasión, implantación, crecimiento y diferenciación fetal y placentaria, y varios mecanismos inmunomoduladores; donde muchas veces, sus concentraciones locales determinan la supervivencia embrionaria (9). Por ejemplo, citoquinas como la IL-4 e IL-10 juegan un rol crucial en el éxito de la gestación, debido a que la deficiencia de IL-4 y/o IL-10 contribuyen a la infertilidad, aborto espontáneo, entre otros (7).

La IL-10 es importante en la fase materno-fetal; puesto que, la disminución de la producción de esta citoquina puede producir fallas reproductivas en el primer trimestre de gestación en humanos (10). En algunas especies animales, como en ratones, los niveles de IL-10 son necesarios para mantener toda la gestación (11). Así como, en yeguas gestantes que presentan niveles altos de IL-10 en el primer tercio de la gestación a diferencia de hembras no gestantes, necesaria para inmunotolerancia al inicio de la gestación (12).

Del mismo modo, la expresión de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, así como la vascularización e infiltración de células del sistema inmunológico desde el torrente sanguíneo hacia el endometrio; estaría regulado por hormonas como el 17-beta estradiol y la progesterona (13, 14).

Por lo que, es de gran importancia conocer el rol de la IL-10 durante la gestación en especies como las alpacas, porque permitirá generar nueva información que contribuya a comprender algunos mecanismos inmunológicos materno-fetales y promover la investigación en esta especie animal que es símbolo de nuestro país.

Por ello el objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles séricos de IL-10 en alpacas hembra durante el primer mes de gestación y su relación con la reabsorción embrionaria en alpacas preñadas.

II. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Explorar la asociación de los niveles séricos de IL-10 y la reabsorción embrionaria en alpacas durante el primer mes de gestación.

2.2 Objetivo específico

- Determinar los niveles de progesterona e IL-10 en alpacas preñadas, alpacas que reabsorbieron el embrión y alpacas no preñadas durante el primer mes post-apareamiento.
- Explorar la correlación entre los niveles de progesterona con los niveles de IL-10 a nivel sérico de alpaca.

III. Marco teórico

3.1 Importancia de los camélidos sudamericanos

Desde hace más de seis mil años los Camélidos Sudamericanos (CSA) han formado parte del ambiente físico y cultural de la región altoandina. Siendo dos las especies domésticas, alpaca (*Vicugna pacos*) y llama (*Lama glama*), las más importantes. Donde la alpaca, es la especie con más número de ejemplares localizadas en el Perú, alcanzando la cifra de 3'685,516 animales (1, 15).

En las comunidades altoandinas, los CSA como las llamas son usadas como animales de carga y alimento por su carne; y las alpacas son su principal fuente de producción de fibras finas (16). Actualmente el 80% de alpacas pertenecen a los pequeños productores de las comunidades altoandinas; y el resto de las alpacas pertenece a diferentes empresas y a medianos productores. Las comunidades, tienen a los camélidos como parte de un sistema complejo de producción, los cuales pueden ser mixtos, agropastoriles (crían a varias especies) o altitudinales (netamente conformados por camélidos) (17).

3.2 Reproducción animal

3.2.1 Conducta reproductiva en camélidos sudamericanos

Las alpacas hembras preñadas presentan una conducta particular ante la presencia de un macho, sirviendo esta información para el diagnóstico gestacional (18). Las alpacas preñadas rechazan al macho al apareamiento, mientras que las hembras vacías

presentan comportamiento de celo (18). Lo mismo se puede observar en llamas supuestamente preñadas, en las cuales a la presencia del macho para el apareamiento, huyen, escupen y patean; y si están vacías se ponen en posición de sentadas (decúbito ventral) (19).

3.2.2 Apareamiento de la alpaca

Las alpacas son animales de ovulación inducida, al igual que otras especies animales (gatos, camellos, etc.) (18). Para dicha ovulación, es necesario que se produzca irritación del endometrio de los cuernos uterinos producidos por la penetración del pene durante el apareamiento (4); dado que esta laceración del endometrio promueve una mejor absorción del factor inductor de la ovulación (OIF), presente en el plasma seminal, necesario para la ovulación de la alpaca (20).

3.2.3 Efecto inmunológico en el apareamiento

Los diferentes componentes del semen, así como la concentración de espermatozoides y la zona donde se deposite pueden estimular la respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria al apareamiento se ve mediada por citoquinas y células como los PMN o células mononucleares; el semen promueve el aumento y activación de neutrófilos contra los espermatozoides (21). Es así que, los PMN destruyen a los espermatozoides y microorganismos a través de los NETS (trampa extracelular de neutrófilos) (22) y la fagocitosis (21). Sin embargo, para evitar la destrucción de los espermatozoides el plasma seminal como el de equinos y bovinos, cuentan con componentes como la

DNAsa, para bloquear el efecto de los NETS (22) o la producción de la proteína CRISP3 que suprime la unión del PMN con el espermatozoide (23).

La gestación se dará de manera correcta, siempre y cuando se de una correcta eliminación del exceso de espermatozoides y de los subproductos inflamatorios que se hayan producido por el apareamiento; mediada por procesos como las contracciones del miometro para la expulsión física (21). Dicha eliminación de espermatozoides deberá ser de manera rápida, para evitar respuestas inmunológicas adquiridas contra los espermatozoides que puedan conllevar a casos de infertilidad (24).

Por lo tanto, el plasma seminal y la inflamación resultante generan tolerancia inmunitaria transitoria a los antígenos presentes en el semen, debido a su contenido de moléculas inmunoreguladoras que activan y modulan la respuesta inmunitaria a los antígenos mediante la liberación de citoquinas (21). Esta exposición al semen es importante para procesos como el desarrollo del embrión antes de la implantación (21).

3.3 Etapas y características de la gestación temprana

3.3.1 Reconocimiento materno de la gestación

Se necesita una adecuada comunicación del concepto y el endometrio materno para establecer y mantener la gestación en los mamíferos (25). En los bovinos, esta comunicación se produce desde antes de la implantación, en el cual se incluye un dialogo de tipo inmunológico que vendría jugar un rol muy importante (26).

Hormonas como la progesterona están involucradas en la regulación del ambiente uterino para el correcto desarrollo e implantación del concepto; así como, en la

formación y el mantenimiento de la placenta (27). La etapa de alargamiento del embrión de alpaca se da alrededor del día 9, coincide con el inicio de la luteólisis en hembras no preñadas que solo ovularon (28); por lo que sería importante el reconocimiento materno de la preñez en estos días y prevenir así la luteólisis (28). Dicha luteólisis inicia el día 7 y finaliza el día 9 o 10 después del apareamiento en llama y alpacas, provocado por la producción de PGF2a (prostaglandina F2 alfa) del endometrio (29). Debido a que, la PGF2 α hace retroceder estructural y funcionalmente al CL (27). Además durante la elongación del blastocisto se produce un aumento en la producción de estradiol contribuyendo así a su reconocimiento materno, observado tanto en cerdos como en rumiantes (28). La producción de estradiol – 17 β entre los días 10 y 15 de gestación tiene una alta capacidad aromatizante pudiendo ser clave para el reconocimiento materno de la preñez (30, 31). Igualmente en alpacas se ha visto que el estradiol tiene un efecto positivo sobre el reconocimiento materno de la preñez (32). Por lo que, hormonas como la progesterona y el estrógeno preparan al útero para recepcionar las señales que produce el concepto para interactuar entre ellos (33).

En rumiantes, la supervivencia del embrión se atribuye a si es capaz de producir señales para el reconocimiento de su presencia, produciendo moléculas como el interferón- tau (5). En bovinos y ovinos, la progesterona y el INF-tau regulan la expresión de genes para que se pueda establecer correctamente la gestación (34, 35). Por lo que, esta citoquina sería necesaria para el reconocimiento de la gestación, al ser producida por el trofoectodermo del concepto (27).

INF-tau también está implicada en la inhibición de los pulsos luteolíticos de PGF2alfa para mantener la función del cuerpo lúteo (36); además de tener funciones paracrinas y endocrinas para prevenir el rechazo al feto (37). Siendo el INF-tau la principal proteína para el reconocimiento materno (38). Se ha observado, que a los primeros 3-4 días en bovinos, se presenta la comunicación entre el embrión y el oviducto (39); al día 4 el concepto produce INF- τ , que actúa sobre las células del sistema inmunológico para promover una respuesta antiinflamatoria en el oviducto (40). Esta producción por parte del concepto sigue aumentando en los siguientes días cuando el concepto pasa a su fase de elongación (del 13 al 15 de gestación) (41). Teniendo así, un efecto sobre el endometrio uterino, el cuerpo lúteo y los leucocitos sanguíneos para un adecuado reconocimiento materno de la preñez y la inmunomodulación para prevenir el rechazo (42); esta modula de la respuesta inmune materna permite el adecuado desarrollo del concepto (43). Sin embargo, no se ha encontrado INF-t en camélidos durante el proceso del reconocimiento materno como en rumiantes (44).

3.3.2 Desarrollo embrionario en la alpaca

En los estadios embrionarios de las alpacas se observa el estado de mórula al día 4, luego pasa a ser un blastocito temprano eclosionado en el día 6; durante los días 6, 7 y 8 post apareamiento el blastocisto pasa al útero, migrando al asta uterina izquierda al día 9 y se elonga entre los días 9 al 10 (28).

Por lo que una señal en el lado derecho por parte del embrión es necesaria para mantener el Cuerpo Lúteo (CL) durante los primeros 8 días post-apareamiento (28).

Sin embargo, hembras que cuentan con el CL en el ovario derecho, tienden a bajar su tasa de gestación (45). En el día 10 el embrión ocupa gran parte del útero al expandirse; y entre los días 11 y 15, los embriones se alargan siendo observables en la ecografía transrectal (28).

La implantación embrionaria en CSA, el blastocisto asume una posición fija e inicia una interacción con el útero, dependerá de la presencia del cuerpo lúteo (46, 47), el cual mantiene la producción de progesterona a lo largo de toda la gestación (11 meses) (48).

3.3.3 Implantación embrionaria

La implantación consiste en varias etapas en las cuales el concepto se aposiciona/attachment, se une, adhiere e invade el endometrio (27).

6.3.3.1 Implantación embrionaria en la alpaca

El blastocito se encuentra libre en el lumen uterino al día 15, para empezar a implantarse en el día 20 de gestación; en el día 22 y 26, el trofoblasto se yuxtapone al epitelio uterino, algunas zonas empiezan a tener contacto y se adhieren mediante la interdigitación (49). La implantación se desarrolla en el cuerno izquierdo uterino pero se extiende hacia el cuerno derecho durante su expansión, haciéndose más grande las áreas de adhesión (49). En el día 30, el trofoblasto cuenta con un tejido conjuntivo extraembrionario que al día 45 empieza a vascularizarse, esta adecuada adherencia entre el trofoblasto y el epitelio uterino da inicio a la formación de la placenta (49).

6.3.3.2 Implantación embrionaria en otras especies

Primero, el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida adquiriendo así la capacidad de adherirse al útero; en algunas especies como roedores y primates el blastocisto se adhiere e invade el endometrio rápidamente después de eclosionar (27). En roedores, la implantación como tal, se daría después de la unión del blastocisto a la superficie al epitelio endometrial uterino (50); donde al cuarto día después del apareamiento cuentan con un útero receptivo para el embrión (51). Durante este periodo entre la eclosión y la implantación, es necesario una adecuada comunicación bioquímica entre el blastocisto y el endometrio uterino para el éxito de la gestación (27).

Por otro lado, en rumiantes ungulados como bovinos y ovinos, el blastocisto se mantiene flotando en el útero durante algunos días mientras se elonga/alargarse luego ocupar casi toda la superficie del epitelio luminal uterino, y así adherirse en regiones especializadas llamadas carúnculas del endometrio. Este periodo de peri implantación es más largo ya que durante este tiempo el trofoectodermo pasa por una extensa proliferación y diferenciación celular; obteniendo una mejor comunicación física y bioquímica entre el blastocisto y el endometrio para finalmente conseguir una unión apropiada entre dicho trofoectodermo semialogénico y el epitelio luminal uterino (27).

Las células uterinas en el periodo de la implantación se transforman de células del estroma endometrial a células deciduales volviéndose más grandes y redondas, esto en un proceso llamado decidualización (52). En ratones, durante la decidualización, se empieza a observar cambios a nivel del endometrio al formarse protuberancias en forma de cuentas en los sitios de implantación (53). Estos sitios de implantación

aumentan en los próximos días, encontrándose que el endometrio decidualizado se vuelve más grueso y el miometrio delgado; volviéndose difícil de diferenciar entre ambas estructuras posteriormente (53).

Además, en el epitelio luminal se ve desarrollo de glándulas secretoras y aparecen grandes protuberancias apicales (pinopodos) y micro vellosidades (54). Para la implantación del concepto al endometrio en bovinos, se requiere del fenómeno de transición epitelio mesénquima (EMT), al igual que otros cambios a nivel uterino (55). Esta transición del epitelio del trofoblasto, es necesario para adquirir características celulares de invasión, para la correcta migración celular al sistema materno; y así mismo, un adecuado desarrollo del trofoblasto y de la formación de la placenta, necesaria para portar nutrientes y gases para el embrión (27).

3.3.4 Factores inmunológicos durante la implantación

Existen múltiples factores que pueden desencadenar fallas en la implantación embrionaria, siendo una de las razones una pobre receptividad uterina (50). Sin embargo, se ha observado que la injuria mecánica a nivel del endometrio mejora la receptividad uterina al embrión, al producirse una reacción inflamatoria a través del sistema inmunológico (50). En humanos, las biopsias durante los tratamientos de fertilización *in vitro*, aumentarían la posibilidad de implantación y la de los embarazos espontáneos (56); por lo que, el éxito de la implantación puede fomentarse por la inflamación provocada por una lesión previa (57).

En ratones se ha observado que las células dendríticas (DC) tendrían un papel en el éxito de la implantación (50). Las DC y macrófagos uterinos al secretar citoquinas pro y anti-inflamatorias, mantendrían el equilibrio de citoquinas Th1/Th2 endometriales contralando así la remodelación y el crecimiento del tejido endometrial (58-60). Por lo que, la escasez de células dendríticas uterinas (CDu) promueven fallas en la implantación y conllevan a la reabsorción embrionaria (61).

Se ha observado que en bovinos, los NK tienen participación sobre los mecanismos inmunológicos vinculados a la comunicación entre el concepto y la madre (62). Las células Nk en circulación suelen ser citotóxicas, pero al migrar al endometrio se diferencian en células uNK (Linfocitos NK uterinas) perdiendo dicha capacidad (63). La producción de quimioquinas como la IL-8, CCL8 y CXCL1 junto con las NKu promueven la migración del trofoblasto (64). Las células NK deciduales (NKd) regulan la invasión del trofoblasto al producir citoquinas como la IL-8 o IP -10 (proteína-10 inducible por interferón) (65); a su vez, secretan factores angiogénicos que promueve el crecimiento vascular para un correcto establecimiento de la decidua (66). Para una implantación embrionaria exitosa, es necesario una baja concentración de TNF- α en la interfaz materno-fetal (67); sin embargo, en humanos se ha observado que el INF- γ es necesario para una correcta implantación (68), y cumple funciones angiogénicas en la placenta de cerdos (69).

Los mastocitos y macrófagos se establecen en el endometrio uterino para mantener el balance entre las reacciones inflamatorias y antiinflamatorias producidos por la unión e implantación embrionaria (26). Los mastocitos en el endometrio son regulados por el estradiol y la progesterona en bovinos (70); aumentando antes de la implantación (71).

Los LT reguladores (Treg) reclutados antes de la implantación durante la gestación temprana dirigen el cambio de la acción inflamatoria a una antiinflamatoria de los macrófagos (72).

3.3.5 Otras moléculas involucradas en la implantación

El blastocito superpuesto en el endometrio uterino es primordial para una correcta unión del trofoectodermo al epitelio y de su progresiva invasión y placentación del trofoblasto (50). Esta implantación se llevara a cabo de manera exitosa mientras que el concepto alargado/ elongado y el endometrio expresen correctamente moléculas de adhesión celular y los receptores respectivos (27).

En el endometrio uterino, el blastocito se ubicara fuera de los lugares bloqueados por carbohidratos de mucina-1 (MUC-1) impidiendo así su unión a un lugar incorrecto (73), así como la MUC-16 que debe encontrarse regulada negativamente para permitir una correcta adhesión del trofoblasto (74).

Por otra parte, las integrinas promueven la adhesión del trofoblasto, siendo expresadas en el endometrio uterino y por el blastocito, uniéndose así a ligandos como fibronectina, vitronectina, trobospondina y osteopontina (ONP) (75).

La L- selectina en humanos se la ha detectado en superficie de los blastocistos después de la salir de la zona pelúcida y funciona como una molécula de soporte para que el embrión se posicione en el endometrio de manera correcta (76-78). En bovinos el concepto podría unirse al endometrio a través del uso de SELL (L-Selectina) del endometrio y selectina-ligando del embrión (55).

El EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) en bovinos suele ser más alto días antes del periodo de implantación y sus receptores (EGFR) aumentan al día 22 (55). Este bEGF endometrial también incrementa el IFN-tau del concepto bovino (79); y en ratones mejora la unión de los blastocistos (80). Además, *in vitro* produce el incremento de VCAM1 en las células epiteliales endometriales (81).

VCAM-1 (molécula de adhesión de células vasculares) se ha detectado también a nivel del trofoblasto, así como en el epitelio uterino, el epitelio glandular uterino y el endotelio durante la implantación (81). En bovinos, la Integrina- α (ITGAV e ITGA5) y β (ITGB1, ITGB3 e ITGB5) son expresadas por el trofoblasto antes de la adhesión al endometrio (27); mientras que para la implantación se tendrían que expresar ITGA4 e ITGA8 (82). Debido a ello, es necesaria la interacción entre otras moléculas como la VCAM-1 e integrina α -4 (ITGA4) del concepto para establecer una adecuada adhesión entre estos (81). Por lo que, al igual que las citoquinas, las moléculas de adhesión ayudarían al inicio de la formación del sitio de transición epitelio-mesenquimal en el trofoectodermo (27).

3.4 Aspectos inmunológicos durante la gestación

Las funciones inmunes del útero se encuentran reguladas cuando los niveles de estrógenos aumentan (83). Está regulada hasta el estro, cuando hay muchas oportunidades para la introducción de patógenos; y la regulación baja durante la fase lútea cuando el útero debe ser capaz de tolerar al feto (84).

En el caso de las alpacas a nivel placentario, se evidencia la interacción de las estructuras materno-embriónicas, encargadas de mantener la estabilidad y viabilidad de la cría; el estroma endometrial próximo al epitelio es más celularizado, conformado mayormente por fibroblastos, macrófagos, plasmocitos y algunos leucocitos, donde su densidad celular se ve incrementada en la fase lútea (85). La progesterona, ayuda en la diferenciación de las glándulas endometriales y aumenta las secreciones de las glándulas del útero, lo que reduce la producción de moco cervical y previene la contractilidad uterina (86); así mismo, las células epiteliales luminales y glandulares del endometrio producen numerosas citoquinas (87). Las citoquinas actúan sobre todos los tipos celulares y pueden ser de tipo pleiotropicas (88); las citoquinas, quimioquinas y otros mediadores inmunológicos pueden ser producidas también por el blastocisto (67).

Las citoquinas de tipo Th2 durante la gestación, en humanos son necesarias para que el trofoblasto secrete hPL (lactogeno placentario humano) y hCG (gonadotropina corionica humana); además de que regulan negativamente la actividad del tipo Th1 (89-91) . En cultivos de embriones humanos, se ha observado que producen sustancias como ICAM-1 e IL-1 α y citoquinas como IL6, IL-8 entre otros; sin embargo, no puede producir citoquinas como la IL-4, IL-5, IL-12, INF- γ e IL-10 (92). La IL-16 y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) son producidas por el embrión y por el endometrio uterino para fomentar la comunicación entre ellos; por lo que, serían importantes durante el desarrollo embrionario y la gestación (26). La IL-6 al inicio de la gestación es importante para garantizar que la inflamación uterina sea un evento equilibrado (93).

En bovinos y otros rumiantes, se ha propuesto que los cambios en Linfocitos Th1 y Th2 en sangre son parte de la respuesta inmunológica ante el feto en la gestación temprana (94, 95). En cerdas preñadas al día 70 tienen un incremento a nivel sérico y placentario de citoquinas como la IL-1 β e IL-2 (Th1), así como de IL-4 (Th2) (96).

IL-4 e IL-10 son citoquinas pleiotropicas antiinflamatorias cuya función es suprimir el medio proinflamatorios; la IL-4 es producida por células T activadas, mastocitos, basófilos, eosinófilos y células NK (11, 97). La IL-4 colabora con la polarización de células Th naive a células Th2 efectoras, así como la propagación de respuesta de Th2 por la unión a su receptor, activando el transductor de señal y el activador de la transcripción (STAT) de seis vías de señalización (98-101). IL-4 también induce la formación de Treg desde células T CD4+naive. Así, IL-4 no solo media la función de células Th2 sino que también juega una parte en la regulación de Tregs el cual juega un rol importante en el éxito de la gestación (7).

3.4.1 IL-10 durante la gestación

IL-10 cumple un papel esencial para la formación y el mantenimiento de la tolerancia durante la gestación (102); además de ser un factor inmunosupresor multifuncional, al regular las funciones de diferentes tipos celulares, así como la necesidad de esta para lograr una gestación normal (103).

5.4.1.1 Mecanismo de acción celular de IL-10

Existen receptores como el IL-10R, el cual esta expresado en varios tipos de células incluyendo trofoblastos placentarios, células del estroma endometrial, macrófagos, y

NK uterinas (11). La IL-10 se une a su receptor a fin IL-10R1 y la unión a IL-10R2 es específica para iniciar la cascada de señalización. IL-10 entonces activa las vías JAK kinasa y STAT. Esto recluta Tyk2 y Jak1 al complejo receptor e induce la fosforilación de los receptores que conducen a la transcripción de genes regulados por IL-10 (104).

La principal acción de IL-10 es su efecto antiinflamatorio inhibiendo citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α (105, 106). También puede inhibir la presentación de antígeno al bloquear la expresión de MHC-II y a las moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 (107). La IL-10 mantiene a las DC inmaduras para evitar su actividad como célula presentadora de antígeno y así prevenir la activación de LT (108).

5.4.1.2 Producción del IL-10

La IL-10 es producida por células Th2 y también por células no inmunológicas (109); siendo también producida por otras subpoblación de células T como la Th1 y Th17, así como monocitos, macrófagos, DC, LB, granulocitos, eosinófilos y mastocitos, o producida por células como los queratinocitos y células epiteliales (105). Además, se ha observado en mujeres gestantes concentraciones más altas de LT productores de citoquinas como la IL-4 e IL-10, tanto a nivel de la sangre periférica como en la interfaz materno-fetal (110).

Se ha observado, que en la gestación temprana, células como las NKd y los macrófagos deciduales, pueden secretar más IL-10 que las Nk periféricos y monocitos; además, la producción a nivel periférico de IL-10 fue superior a otras citoquinas como IL-4 e INF-

γ (111). Se ha observado en el primer mes de gestación en humanos, que los Nk deciduales y macrófagos deciduales producen mayor cantidad de citoquinas como el INF-gamma, IL-4 e IL-10 comparado con los Nk y macrófagos (monocitos) sanguíneos; además, que la IL-10 fue la que se encontró mayor cantidad a nivel de las células obtenidas de la decidua que de las sanguíneas. Así mismo, se observó que los macrófagos deciduales fueron los principales productores de la IL-10; demostrando el gran papel inmunoregulador que el macrófago cumple (112).

5.4.1.3 Efecto de la IL-10 durante la gestación

Los niveles de IL-10 se encuentran regulados con precisión durante diferentes etapas de la gestación (102). Se sabe que los niveles reducidos de la IL-10 están vinculados con resultados adversos de la gestación, como pérdidas de la gestación, preeclampsia y partos prematuros (102). En gestaciones de alto riesgo, con complicaciones como trastornos hipertensivos como la preeclampsia, gestaciones múltiples y trastornos trombóticos, los niveles de IL-10 se encuentran más reducidos que los niveles en una gestación normal (111).

En modelos de rata con preeclampsia, se observó que presentaron niveles de IL-10 bajos a diferencia de ratas con gestación normal y ratas con preeclampsia dosificadas con IL-10 intraperitoneal; así mismo, se observó reducción de la presión arterial en las ratas dosificadas (106). Así mismo, en las ratas dosificadas presentaron un aumento de LTreg y una reducción de los LTCD4, similar a las ratas con gestación normal; de este modo, la IL-10 al estimular a las Treg, llevaría a la normalidad gestaciones afectadas por isquemia placentaria (106).

Por lo que, la IL-10 sería un importante factor para una gestación normal (106), y sería de utilidad como predictor de complicaciones de la gestación (111).

Así mismo, durante el primer trimestre de gestación en mujeres, se observa que los LT $\gamma\delta$ deciduales y los de circulación periférica aumentan a diferencia de mujeres no gestantes; siendo los LT $\gamma\delta$ deciduales hallados en mayor proporción que los circulantes (113). Estos LT $\gamma\delta$ producen diferentes citoquinas, siendo la producida en altos niveles la IL-10, seguida del TGF- β 1, y bajos niveles de TNF- α , INF- γ , IL-2 e IL-4; todo ello indicaría que estas células LT $\gamma\delta$ y por ende las citoquinas que producen, jugarían un papel importante para la inmunotolerancia materna (113). Otro aspecto importante, es que se ha observado que los LT $\gamma\delta$ deciduales promoverían la proliferación del trofoblasto, suprimiendo la apoptosis de las células del trofoblasto, e induciendo la invasión del trofoblasto en humanos y todo mediado por la IL-10 (113).

En cerdas gestantes durante la etapa de la implantación embrionaria (día 17), se observó una mayor expresión de IL-10 sérica a comparación de hembras no gestantes pero con cuerpo lúteo presente; y en cuanto al INF- γ , se vio la expresión invertida de estos valores (114). Además, la IL-10 tendría su efecto inmunomodulador a nivel sistémico más que local, debido a que en cerdas gestantes se encontró mayormente expresado en suero sanguíneo que a nivel de tejidos placentarios (114). De igual forma, en humanos, tampoco presenta relación los niveles de IL-10 placentarios con los niveles séricos (115).

Las funciones de la IL-10 y el TNF- α depende del equilibrio entre ellas, donde la IL-10 presentara una acción inmunosupresora con la TNF- α ; sin embargo, la no regulación

entre ellas, genera que el TNF- α sea un factor diabetogénico adicional en la gestación (116). Donde mujeres con diabetes gestacional presentan mayor producción de TNF- α , a comparación de mujeres gestantes no diabéticas; observándose un aumento del ratio TNF- α /IL-10 en gestaciones con hiperglicemia tanto a nivel sanguíneo como placentario (117). Y las complicaciones de la diabetes durante la gestación, observada en diferentes modelos animales, son el aumento de las tasas de pérdida embrionaria, abortos espontáneos, malformaciones, alteraciones feto-placentarias (118).

5.4.1.4 Regulación de la respuesta inmunológica de la madre gestante

En un experimento en el que usaron ratones IL-10^{-/-} preñadas vs ratones salvajes preñadas se pudo observar que no hubo diferencias en el tamaño o desarrollo lo que indicaría que la IL-10 no es esencial para la gestación (104). Sin embargo, la IL-10 aunque no sea esencial para el crecimiento y el desarrollo del feto en ratones, tiene un papel importante en la inhibición de la inflamación excesiva; en ratones IL-10^{-/-} preñadas presentaron más susceptibilidad a la inflamación a bajas dosis de LPS comparado con los ratones salvajes (119, 120). Por lo que, la regulación precisa de IL-4 e IL-10 son importantes para acortar la inflamación maternal y permite la comunicación cruzada entre la decidua-placenta, y la invasión del trofoblasto fetal en los diferentes estadios de la gestación (7).

La mayor cantidad de leucocitos en la interfaz materno fetal son los macrófagos deciduales, promueven la resistencia ante infecciones a través de la presentación de antígeno y fagocitosis; además, son capaces de suprimir respuestas inmunes exacerbadas para evitar el rechazo inmunológico mediante la secreción de factores

antinflamatorios y la reducción de la toxicidad de las células NK, generado así la homeostasis inmune necesaria durante la gestación (121, 122).

Por lo tanto, la IL-10 es una citoquina inmunosupresora crítica para mantener un correcto balance inmunológico; necesario para establecer una correcta tolerancia inmunológica materno-fetal durante la gestación (102). Debido a que desde la implantación y a lo largo de toda la gestación, la IL-10 sería la citoquina clave para una gestación normal (116).

3.5 Regulación inmunológica por hormonas durante la gestación

Las hormonas esteroideas se producen principalmente en órganos endocrinos tales como la corteza suprarrenal, ovario y el testículo. Sin embargo, se ha informado de que las células T o células del estroma alrededor de las células T expresan mRNA de enzimas metabolizantes de esteroides y pueden producir o metabolizar la hormona esteroide (123). Debido a que los LT, monocitos y macrófagos tisulares tienen receptores de estrógenos; a su vez los estrógenos tendrían un efecto inmunomodulador regulando así la respuesta inmunológica (124, 125).

3.5.1 Mecanismo inmunológico de la Progesterona

La progesterona, hormona sexual que se incrementa significativamente durante la gestación, tiene efectos inmunosupresores y desvía el equilibrio inmune al tipo Th2 (126, 127). Esta al interactuar con sus receptores en la decidua, funcionaría como un mecanismo de defensa por parte del trofoblasto (128).

Se ha observado que en ratones gestantes la respuesta inmune tipo Th1 induce altas tasas de reabsorción espontánea; en contraste la producción de citoquinas tipo Th2 resulta en el éxito de la gestación (129, 130). Además, el factor inhibidor de la leucemia (LIF) que está regulado por la progesterona, es un factor esencial para la implantación del embrión, debido a que aumenta las respuestas Th2 (110). La expresión de LIF se ha observado en glándulas endometriales uterinas antes del comienzo de la implantación en ratones (131). Adicionalmente, la progesterona, junto con los linfocitos activos y las células CD56+ deciduales sintetizan el factor de bloqueo inducido por progesterona (PIBF) que cumple como sustancia antiabortiva (128). Este PIBF tendría un efecto sobre el sistema inmunológico humoral (LB) y celular (LT) y por la supresión de la actividad de células NK (132).

En un experimento, se observó que las células Th2 pero no las células Th1 expresan ARNm de P450_{scc} y 20 α -HSD, que convierten 22R-hidroxicolesterol en pregnenolona y progesterona en 20 α -hidroxiprogesterona, respectivamente (datos no publicados). Como resultado, las células Th2 pero no las células Th1 producen pregnenolona cuando se añadió 22R-hidroxicolesterol al cultivo. La pregnenolona sintetizada se convirtió adicionalmente en progesterona mediante 3 β -HSD expresado en fibroblastos embrionarios murinos. En realidad, la administración in vivo de 22R-hidroxicolesterol con transferencia de células Th2 aumentó el nivel de progesterona en suero de ratón. Curiosamente, las células Th2 pero no las células Th1 expresaron 20 α -HSD, que es esencial para metabolizar la progesterona. Por lo que, las células Th2 apoyaron la producción de progesterona, pero ellos mismos eran resistentes a la acción citotóxica

de la progesterona porque podían convertir la progesterona en 20a-hidroxiprogesterona no tóxica con 20a-HSD. Mientras que las células Th1 mostraron una muerte celular apoptótica en respuesta a la misma concentración de progesterona. Además, la adición de progesterona promueve la desviación de las células Th2 de las células T helper naïve. Por lo tanto, las células Th2 y células del estroma cooperan para producir progesterona a partir del colesterol para mejorar la desviación a la inmunidad tipo Th2. La diferente susceptibilidad a la progesterona entre las células Th1 y Th2 podría ser uno de los mecanismos para aumentar la inmunidad tipo Th2 durante la gestación porque se observa un alto nivel de progesterona sérica en comparación con la condición no gestante. Como se demostró en modelos de ratón, la administración de progesterona puede convertirse en una de las terapias eficaces contra las enfermedades autoinmunitarias de tipo Th1 al suprimir las respuestas Th1 (paper original) (123).

4.6 Perdida de la gestación

4.6.1 Causas de pérdidas embrionarias en rumiantes

Las pérdidas embrionarias en rumiantes suelen suceder hasta el día 45 de la gestación; siendo la mayor ocurrencia durante el periodo de implantación. Esta supervivencia del embrión se ve afectada por parte de la comunicación materno – embrionaria que depende de las condiciones de la hembra y la calidad del embrión; así como por otros factores como ambientales y genéticos; además, depende de la producción adecuada de P4 (5), debido a que una fase lútea corta o deficiente de P4 aumentaría la posibilidad de pérdida embrionaria temprana en los animales (133).

La supervivencia embrionaria puede estar mediado por factores maternos como el equilibrio hormonal durante el pre-apareamiento, la receptividad uterina y las funciones lúteas; óvulos envejecidos o mal desarrollados pueden traer como consecuencia embriones de baja calidad y ser más susceptibles a su pérdida (5, 134). A veces en la interface útero-embrionarias hasta los 30 días de preñez en bovinos, no resiste al proceso histológico lo cual facilita su separación (85). Por consiguiente, los fallos en la implantación y/o el desarrollo del trofoblasto pueden desencadenar una mala formación de la placenta, provocando así que la gestación no se lleve de manera adecuada (27).

Otro aspecto observado a nivel inmunológico, es que la proliferación y desarrollo del trofoblasto durante un excesivo e inadecuado reclutamiento de las células NK en sangre periférica produce un ambiente citotóxico uterino (135). Por lo tanto, el aumento de células NK y de las proporciones de células Th1/Th2 a nivel periférico de la madre producen una respuesta inflamatoria, produciendo pérdidas de la gestación y fallos durante la implantación (67).

4.6.2 Mecanismo de la reabsorción embrionaria

En roedores se ha observado que, la reabsorción embrionaria cuenta con cuatro etapas importantes: primero se retrasa el crecimiento del concepto, luego se observan bradicardia y edema pericárdico, posteriormente cesa su crecimiento y se da la muerte del embrión y finalmente las células inmunitarias maternas reabsorben el embrión eliminando los restos que quedaban de este (53). En ratones, al inicio de la reabsorción se empieza a observar las cavidades embrionarias más pequeñas, con una mala

definición o nula de sus membranas, llena de material proteico; además, la zona de la placentación contiene tejido del trofoblasto condensado, tejido fibrinoide y hemorragia materna en la decidua basal (53).

En los embriones de ratón que se reabsorben se pueden observar células apoptóticas en el embrión mientras que la placenta puede mantenerse intacta; desapareciendo primero el embrión y luego sus membranas, quedando solo la cavidad embrionaria (53). La combinación de citoquinas de tipo Th1 como la TNF- α e INF- γ , provocan la apoptosis del trofoblasto (136, 137). Citoquinas como el INF- γ (Th1) en cerdos es producida por células del trofoblasto (138); pudiendo provocar la muerte embrionaria y fetal (139). Durante la muerte embrionaria en cerdos, el concepto de 15 y 23 días de gestación, expresa un aumento de citoquinas pro-inflamatorias como el INF- γ , TNF- α e IL-1 (138).

Membranas como a membrana de Reichert en ratones, es la última en desaparecer; y es entre esta membrana de Reichert y la capa del trofoblasto gigante en la zona de la decidua capsular donde se llenará de sangre materna; además, a nivel del alantoides se encontrarán eritrocitos, neutrófilos y linfocitos maternos. Estos restos del embrión apoptótico deben de removerse del útero mediante una reacción inmunológica general; a pesar de la apoptosis del embrión, la placenta aún puede mantenerse intacta (53).

Por lo que la implantación puede fallar por la desregulación local o sistémica por parte del sistema inmunológico; por otro lado, se podría mejorar la receptividad del endometrio a través de la manipulación de las citoquinas para mejorar la tasa de implantación y el resultado reproductivo (67).

IV. Metodología

4.1 Diseño del estudio

El presente estudio fue de tipo exploratorio de una serie de casos, longitudinal y observacional de diez (10) especímenes de alpacas, en las cuales se evaluó los niveles de IL- 10 y progesterona (P4) en 8 momentos en los primeros 30 días desde el apareamiento.

Se observaron 10 alpacas hembra que fueron sometidas al apareamiento o monta natural pertenecientes al laboratorio de Reproducción Animal de la UNMSM. Para seleccionar a las alpacas para el apareamiento, se les realizó una ecografía previa con el objetivo de determinar el tamaño del folículo dominante; siendo, las hembras con folículos \geq a 6 mm (140), apareadas con machos de comprobada fertilidad. Los días 15 y 18 post-apareamiento se realizó la prueba de rechazo al macho, la cual es un método para confirmar si las hembras estaban preñadas o no (141). La viabilidad de la gestación se evaluó por ecografía los días 21, 24, 27 y 30 post-apareamiento, observando la presencia o ausencia de la vesícula embrionaria y del embrión, y así poder clasificarlas según el resultado del apareamiento. Se realizaron tomas de muestra sanguínea a todas las hembras los días 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 post-apareamiento, para la evaluación de los niveles de IL-10 y progesterona (P4).

4.1.1 Grupos según el resultado del apareamiento

Las 10 alpacas hembra apareadas, fueron agrupadas según el resultado del apareamiento, en los siguientes 3 grupos:

- **G1:** hembras que rechazaron al macho los días 15 y 18, y a la ecografía tuvieron presencia de vesícula embrionaria, por lo tanto, quedaron **preñadas** (n=4).
- **G2:** Hembras que rechazaron al macho los días 15 y 18, y a la ecografía no tenían vesícula embrionaria por lo que **reabsorbieron el embrión** (n=2).
- **G3:** Hembras que no rechazaron al macho los días 15 y 18, que a la ecografía se encontraron vacías, por lo tanto, **no quedaron preñadas** (n=4).

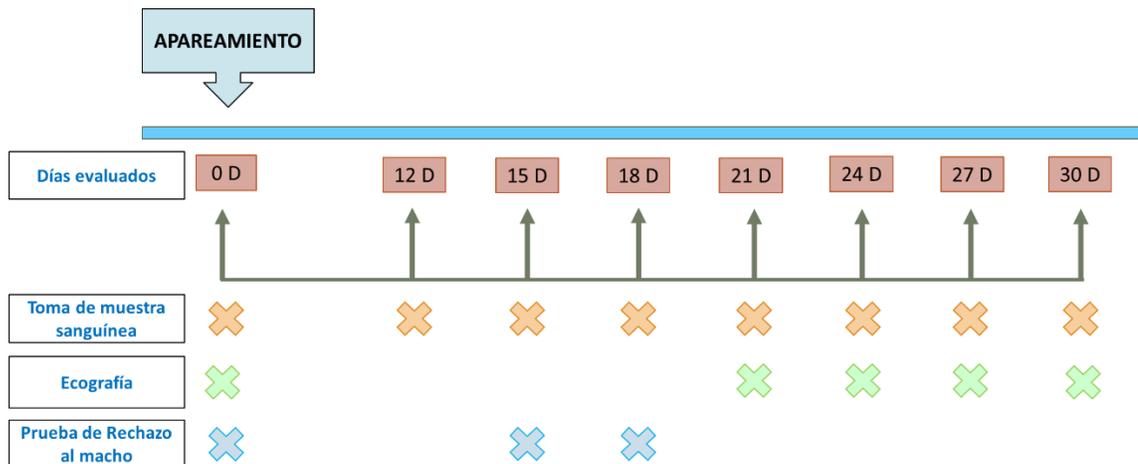


Figura 1. Diseño del estudio para la evaluación del resultado al apareamiento y toma de muestras de las alpacas post – apareamiento

4.2 Población

Se estudió a 10 alpacas (*Vicugna pacos*) hembras de la raza Huacaya de 6-8 años (figura 2), con antecedentes reproductivos, aparentemente sanas. Estas fueron apareadas con machos fértiles de la misma raza, pertenecientes al laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la UNMSM, Lima.

Criterios de inclusión

- Alpacas hembra con antecedentes reproductivos
- Alpacas con folículos de ≥ 6 mm
- Hembras que se aparearon durante un tiempo ≥ 15 minutos

Criterios de exclusión

- Alpacas preñadas.

4.3 Procedimientos y técnicas aplicadas

4.3.1 Apareamiento de las hembras

Las alpacas hembra que contaban con folículos dominantes ≥ 6 mm a la ecografía entraron en el estudio, esto con el fin de conseguir la ovulación con el apareamiento del macho. Todas las hembras fueron apareadas con machos fértiles de la raza Huacaya en el día 0 del estudio durante un tiempo ≥ 15 minutos.

4.3.2 Toma de muestra sanguínea y obtención de suero sanguíneo

Para la toma de muestra sanguínea, se llevó a los animales a un corral más pequeño y se sujetó a los animales tomando el cuello con un brazo, y con el otro se sujetó por el pliegue inguinal para evitar que el animal se mueva; además se le colocó una capucha para reducir el estrés durante su manipulación. Se palparon las apófisis transversales y a la altura de la base del cuello, se ubicó a la vena yugular ubicada a lo largo del cuello. Se procedió a la toma de muestra sanguínea, se desinfectó el área con alcohol de 70° y se realizó la hemostasia y la venopunción correspondiente.

Se realizaron 8 colectas por animal, totalizando 80 muestras sanguíneas, en tubos Vacutainer color amarillo (con gel separador) en los días del 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 post - apareamiento. Para obtener el suero sanguíneo, se centrifugaron las muestras sanguíneas por 35 min a 3000 rpm; una vez separado, se procedió a la conservación de cada muestra en crioviales estériles que posteriormente fueron almacenados a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

4.3.3 Ecografía transrectal

Se utilizó un ecógrafo de la marca ALOKA SSD 500, equipado con un transductor lineal de 5.0 MHz. Las ecografías se realizaron cuando los animales estaban sujetos, se procedió a hacer una ecografía con el animal en pie o esfinge, y se observó la presencia o ausencia de la vesícula embrionaria y del embrión.

4.3.4 Prueba de rechazo al macho

Esta técnica se usó para evaluar la receptividad al macho durante los días que no se realizaron ecografías. Con el fin de determinar la receptividad (no rechaza al macho) de las hembras los días 15 y 18 post apareamiento; esta técnica confirmaría si las hembras estaban o no preñadas los días evaluados (141). Luego se las clasificó en hembras que rechazaban al macho (R) o en hembras que no rechazaron al macho (NR).

4.3.5 Evaluación de los niveles de IL-10

Se utilizó un kit de ELISA bovino para la detección de IL-10 en suero sanguíneo de la marca CUSABIO. Se evaluó IL-10 en suero con un kit de ELISA Bovino, debido a que no existen kits comerciales de ELISA que midan IL-10 en Alpacas. Otro aspecto que

se tomó en cuenta, fue que existe reacción cruzada de IL-10 entre otras especies de camélidos, como camellos con bovinos, humanos y ratones (142); siendo el Kit de ELISA Bovino una alternativa para la medición de citoquinas en camélidos (143), como las alpacas del presente estudio.

El cual se ejecutó según las indicaciones del manual del fabricante; se evaluaron los niveles de IL-10 en suero por duplicado, los días 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 después del apareamiento. Dicho procedimiento fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur.

Protocolo:

1. Se llevaron todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente antes de usar.
Se centrifugo la muestra nuevamente después de descongelarla antes del ensayo. Se prepararon todos los reactivos y muestras según las indicaciones del fabricante.
2. Se determinó el número de pocillos que se utilizaron y se realizó un mapa para la identificación de cada pocillo.
3. Se estableció un espacio en blanco sin ninguna solución.
4. Se agregaron 50 µl de estándar o muestra por pocillo. Los estándares y las muestras se procesaron por duplicado.
5. Se agregó 50 µl de HRP-conjugado a cada pocillo (no al blanco), luego 50 µl de anticuerpo a cada pocillo. Se mezcló bien y luego se incubó durante 1 hora a 37 ° C.

6. Se aspiró cada pocillo y lave, repitiendo el proceso dos veces para un total de tres lavados. Se lavó llenando cada pocillo con la solución tampón de lavado (200 μ l) usando una pipeta multicanal, y se dejó reposar durante 10 segundos, eliminando completamente el líquido en cada paso. Después del último lavado, se eliminó cualquier tampón de lavado restante decantando la placa. Se volteó la placa y se secó contra toallas de papel limpias.
7. Se agregó 50 μ l de sustrato A y 50 μ l de sustrato B a cada pocillo, se mezcló bien. Se incubó durante 15 minutos a 37 ° C. Se mantuvo la placa alejada de corrientes de aire y otras fluctuaciones de temperatura en oscuridad.
8. Se agregó 50 μ l de solución de parada a cada pocillo, se golpeó suavemente la placa para asegurar una mezcla completa.
9. Luego se determinó la densidad óptica de cada pocillo en 10 minutos, usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

4.3.6 Evaluación de los niveles de progesterona

Para la medición de los niveles de progesterona, se utilizó el kit PROG-RIA-CT de la marca DIAsource Inmuno Assays S.A.; esta suele ser la técnica de elección en diferentes investigaciones, para medir progesterona sérica en camélidos sudamericanos como las alpacas (144).

Esta técnica fue ejecutada por un laboratorio especializado en la técnica de RIA según las indicaciones del fabricante. Los sueros fueron evaluados por duplicado, los días evaluados fueron el día 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 después del apareamiento.

Protocolo:

1. Se marcaron los tubos recubiertos por duplicado a cada uno de los tubos estándar, así como a los tubos para las muestras y controles.
2. Se agitó brevemente los calibradores, muestras y controles y se dispuso 50 ul de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Se colocó 500 ul de PROG marcado con 125 en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos a las Cuentas Totales
4. Se agitó suavemente el soporte de tubos a mano para liberar cualquier burbuja de aire atrapada.
5. Se incubó durante 2 horas a 37°C en un baño de agua (baño maría)
6. Se aspiró el contenido de cada tubo (excepto los de recuento total). Asegurando de que la punta de plástico del aspirador alcance el fondo del tubo recubierto para eliminar todo el líquido.
7. Se lavaron los tubos con 3 ml de solución de lavado en funcionamiento (excepto los de recuento total) y se aspiró.
8. Los tubos se dejaron en posición vertical durante dos minutos y se aspiró la última gota de líquido restante.
9. Se contaron los tubos en un contador gamma durante 60 segundos.

4.4 Consideraciones éticas

Este proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia previo a su ejecución.

4.4.1 Sobre el manejo de animales

Los animales pertenecientes al Laboratorio de Reproducción Animal de la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, se mantuvieron bajo un sistema estabulado. Donde contaron con alimentación en base a heno de alfalfa y alimento balanceado/concentrado dos veces al día (8am y 4 pm aproximadamente), además contaron con agua *ad libitum* dentro de los corrales y estos contaban con sombra para protegerse del calor durante el día.



Figura 2. Corral de alpacas hembras de la UNMSM

4.4.2 Sobre la ecografía y toma de muestras

1. Ecografía transrectal

Para reducir el daño o dolor al animal, el transductor del ecógrafo fue sostenido por un mango de pvc previamente lubricado con gel para ecografías. La ecografía fue realizada con los animales en posición de esfinge o de pie según la comodidad del animal, y se les colocó una capucha en la cabeza para tapar ojos y orejas para reducir el estrés de los animales.

2. Toma de muestra sanguínea

La toma de muestra sanguínea se realizó manteniendo al animal en la misma posición al momento de la ecografía, con la capucha puesta. Se sostenía el cuello del animal firmemente para tomar la muestra correspondiente. Inmediatamente después se las llevaba a su corral junto con los demás animales.

4.5 Plan de análisis estadístico

Se calcularon las medias y desviación estándar para el tamaño folicular y el tiempo del apareamiento, por grupo de alpacas.

En las variables de P4 e IL-10 presentó datos faltantes por lo cual se realizó la imputación de datos en base a la media de los grupos analizados para obtener grupos homogéneos para el análisis de los datos.

El análisis consistió en una prueba de normalidad por Shapiro-Will, entre las variables progesterona y citoquina entre los días y el resultado del apareamiento. Para el análisis

de las concentraciones de progesterona- resultado del apareamiento y días; y citoquinas- resultado del apareamiento y días, se utilizó las medianas de dichas variables y se aplicó la prueba estadística de Kruskal - Wallis para datos no paramétricos usando el programa estadístico R. Así mismo, se realizó la comparación para los datos que presentaron diferencias estadísticamente significativas en la prueba estadística post hoc de Dunn.

Además, se evaluó la correlación entre la progesterona (P4) y la interleuquina 10 (IL-10) en alpacas, con la prueba de correlación de Spearman. Adicionalmente se presentan tablas con los resultados individuales de los animales según los días evaluados tanto para P4 como para IL-10.

V. Resultados

5.1 Evaluación ecográfica día 0 del apareamiento y tiempo de apareamiento

Las hembras que entraron al estudio fueron apareadas al tener folículos dominantes $\geq 6\text{mm}$ al día 0 del apareamiento, además en el siguiente cuadro se observan los tiempos de apareamiento a los que estuvieron expuestas en cada grupo (cuadro 1).

Cuadro 1. Tamaño de los folículos dominantes en las hembras evaluadas y tiempo de apareamiento

Grupos	n=10	Tamaño (mm)	σ	Tiempo de apareamiento	σ
G1	4	7.00	± 0.81	18.00	± 2.94
G2	2	7.50	± 0.70	18.50	± 2.12
G3	4	7.33	± 0.52	17.25	± 2.63

σ = desviación estándar

5.2 Evaluación de la gestación con la prueba de Rechazo al macho y ecografía

Las hembras evaluadas a la prueba de rechazo al macho en los días 15 y 18, se observó que las hembras tanto del grupo G1 y G2, rechazaron al macho. A diferencia del G3, que no rechazó al macho en ninguno de los días evaluados (Cuadro 2).

Sobre las ecografías transrectales, se evaluó la presencia de la vesícula embrionaria para determinar gestación en los días 21, 24, 27 y 30 post apareamiento, los resultados obtenidos a la ecografía en cada grupo (cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados sobre la gestación de los grupos evaluados, durante los días 15, 18, 21, 24, 27 y 30 post apareamiento

Grupos	n	Prueba de Rechazo al macho*				Resultados a la ecografía			
		D15		D18		D 21	D 24	D 27	D 30
		R	NR	R	NR				
G1	4	4	0	4	0	Preñada	Preñada	Preñada	Preñada
G2	2	2	0	2	0	Restos	Restos	Vacía	Vacía
G3	4	0	4	0	4	Vacía	Vacía	Vacía	Vacía

R= Rechazo al macho

NR= No rechazaron al macho

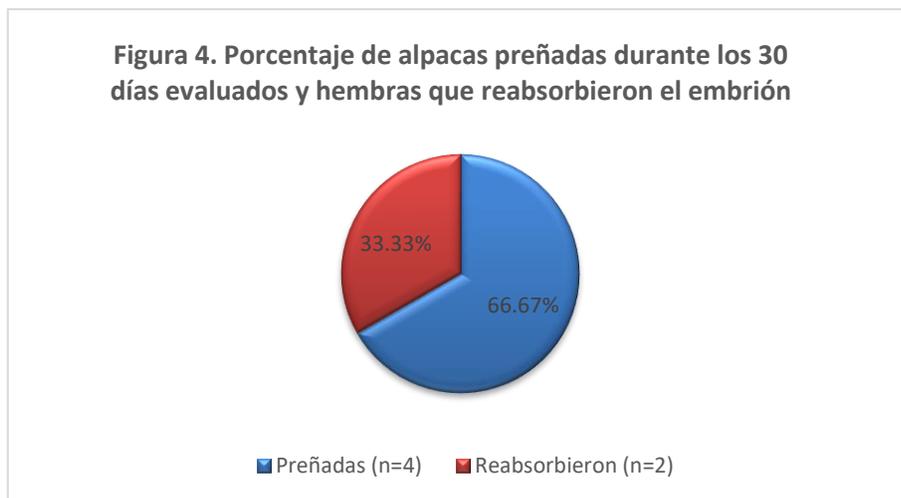
5.3 Resultados post- apareamiento

5.3.1 Resultados de hembras que quedaron preñadas

De todas las alpacas apareadas (n=10), el 60% (n=6) quedaron preñadas y el 40% (n=4) no preñaron (figura 3).



Por otra parte, del total de hembras que preñaron (n=6), el 66,67% (n=4) de las hembras mantuvieron la gestación durante todos los 30 días post - apareamiento, y el 33.33% (n=2) de ellas reabsorbieron el embrión (Figura 4).



5.4 Resultados ecográficos de las hembras preñadas (G1) – presencia de la vesícula embrionaria

Figura 5. Evidencia de la vesícula embrionaria de alpaca (G1) al día 21 post-apareamiento.



Figura 6. Evidencia de la vesícula embrionaria de alpaca (G1) al día 24 post-apareamiento.



Figura 7. Evidencia de la vesícula embrionaria de alpaca (G1) al día 27 post-apareamiento.

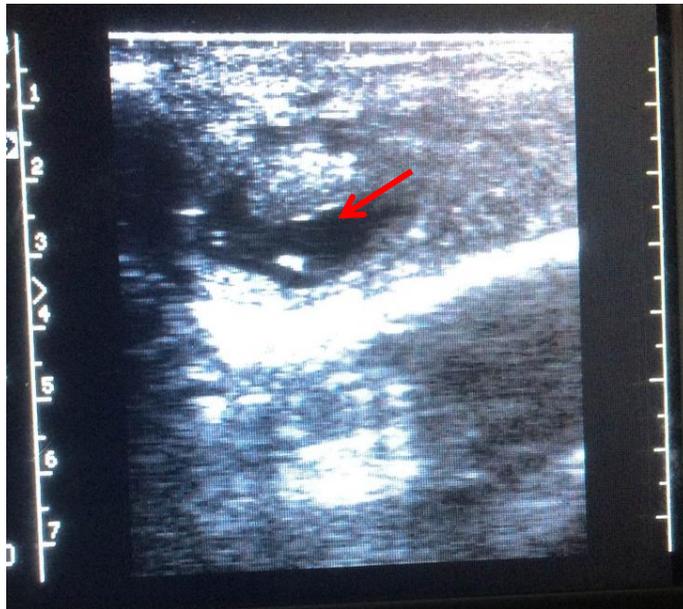


Figura 8. Evidencia de la vesícula embrionaria en alpaca (G1) al día 30 post-apareamiento



5.5 Niveles de Interleuquina-10 (IL-10)

5.5.1 Niveles de IL-10 en las alpacas del G1, G2 y G3 por día de evaluación:

Cuadro 3. Concentraciones de IL-10 (pg/ml) séricas en alpacas según el resultado del apareamiento a lo largo de 30 días post apareamiento

Grupos		D0	D12	D15	D18	D21	D24	D27	D30
G1	Me	18.27	24.01	31.04	31.69	39.52	38.11	24.76	27.15
	RIQ	10.48	28.02	28.7	26.36	39.32	42.57	26.83	28.49
G2	Me	17.20	17.11	20.96	20.46	23.36	23.26	20.12	16.97
	RIQ	14.88	10.68	11.15	12.73	12.99	10.74	10.93	9.58
G3	Me	9.29	4.95	5.77	6.02	5.78	8.35	11.10	8.48
	RIQ	10.04	8.96	10.06	11.79	14.5	13.79	19.01	17.07

Me= mediana

RIQ = rango intercuartílico

5.5.2 Comparación de IL-10 entre los grupos resultantes del apareamiento (G1, G2, G3) en cada día de evaluación (0, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30):

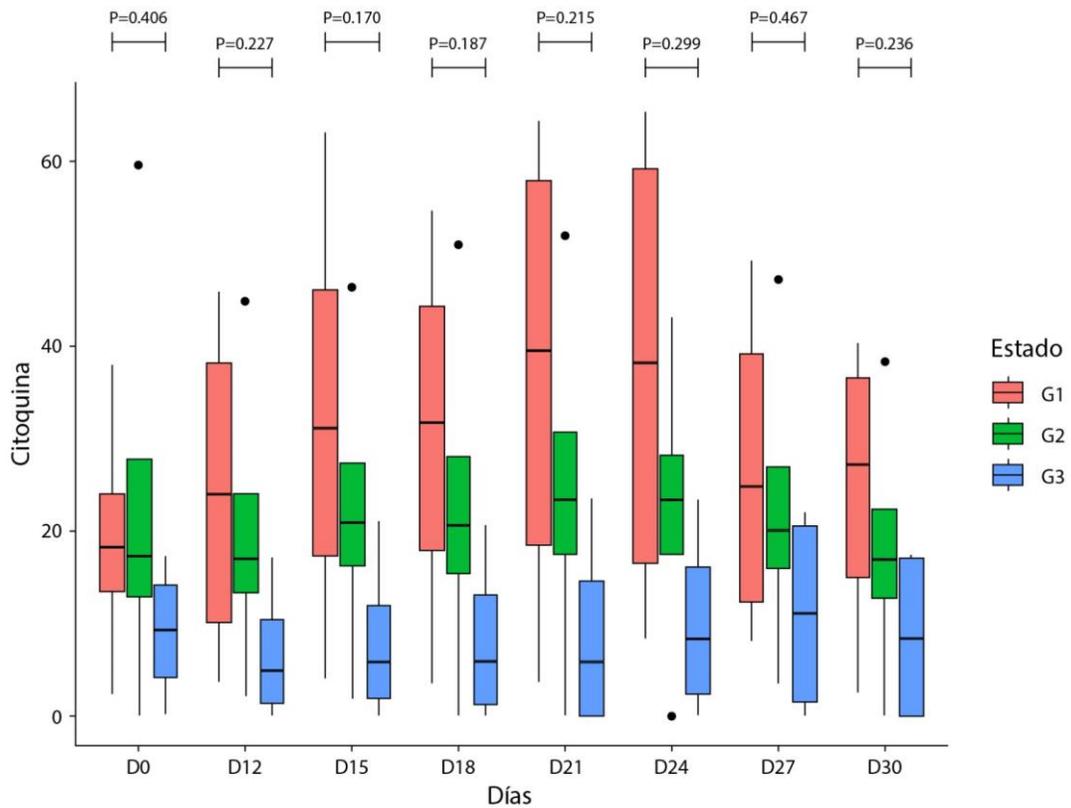


Figura 9. Sobre los niveles de IL-10 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos G1 y G3 ($p > 0.05$), G1 y G2 ($p > 0.05$), y G2 y G3 ($p > 0.05$), en ninguno de los días evaluados (0, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 post-apareamiento).

5.6 Niveles de progesterona

5.6.1 Niveles de P4 en las alpacas del G1, G2 y G3 por día de evaluación:

Cuadro 5. Concentraciones de P4 (ng/ml) séricas en alpacas según el resultado del apareamiento a lo largo de 30 días post apareamiento

Grupos		D0	D12	D15	D18	D21	D24	D27	D30
G1	Me	0.42	4.35	4.90	4.45	5.45	5.1	6.5	6.05
	RIQ	0.23	2.93	3.2	2.24	1.25	1.13	1.15	3.16
G2	Me	0.77	7.40	6.31	4.72	3.12	2.81	3.96	3.29
	RIQ	0.32	4.69	4.25	2.9	0.76	0.39	1.31	1
G3	Me	0.73	0.73	0.70	0.81	0.71	0.76	0.95	0.76
	RIQ	0.4	1.85	0.18	0.35	0.26	0.14	0.15	0.58

Me= medianas

RIQ = rango intercuartílico

5.6.2 Comparación de P4 (ng/ml) entre los grupos resultantes del apareamiento (G1, G2, G3) en cada día de evaluación (0, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30):

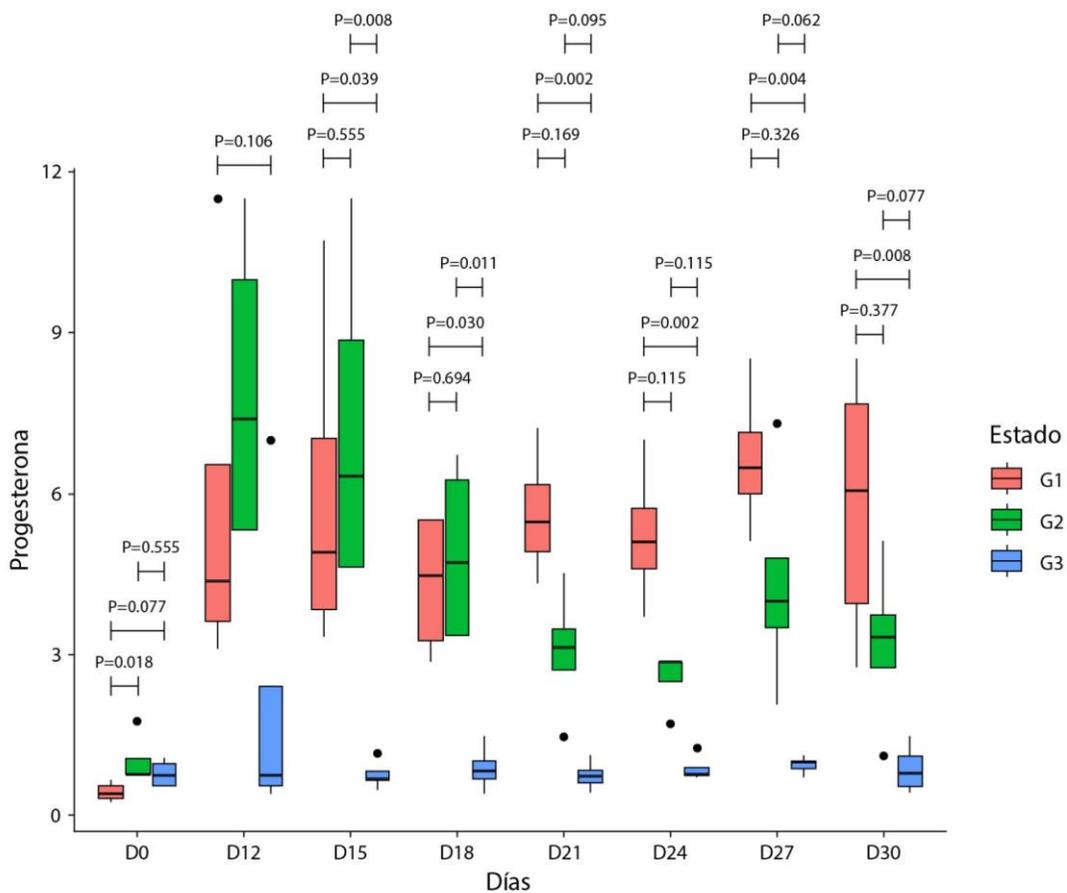


Figura 10. Sobre los niveles de P4 en los días evaluados, se observaron algunos días con diferencias entre los grupos G1, G2 y G3. **Día 0:** Hubo diferencias entre los grupos G1 y G2 ($p < 0.05$); pero, no hubo diferencia entre los grupos G1 y G3 ($p > 0.05$), y entre el G2 y G3 ($p > 0.05$). **Día 12:** no se encontraron diferencias significativas entre los grupos evaluados, G1, G2 y G3 ($p > 0.05$). **Día 15:** se encontraron diferencias significativas entre los grupos G1 y G3 ($p < 0.05$) y G2 y G3 ($p < 0.05$); pero no hubo diferencia significativa entre G1 y G2 ($p > 0.05$). **Día 18:** se encontraron diferencias significativas entre G1 y G3 ($p < 0.05$) y G2 y G3 ($p < 0.05$); pero no hubo diferencia

significativa entre G1 y G2 ($p>0.05$). **Día 21, 24, 27 y 30:** solo se encontraron diferencias significativas entre G1 y G3 ($p<0.05$); y no hubo diferencias significativas entre G1 y G2 ($p>0.05$), y G2 y G3 ($p>0.05$).

5.7 Correlación de la progesterona y la IL-10

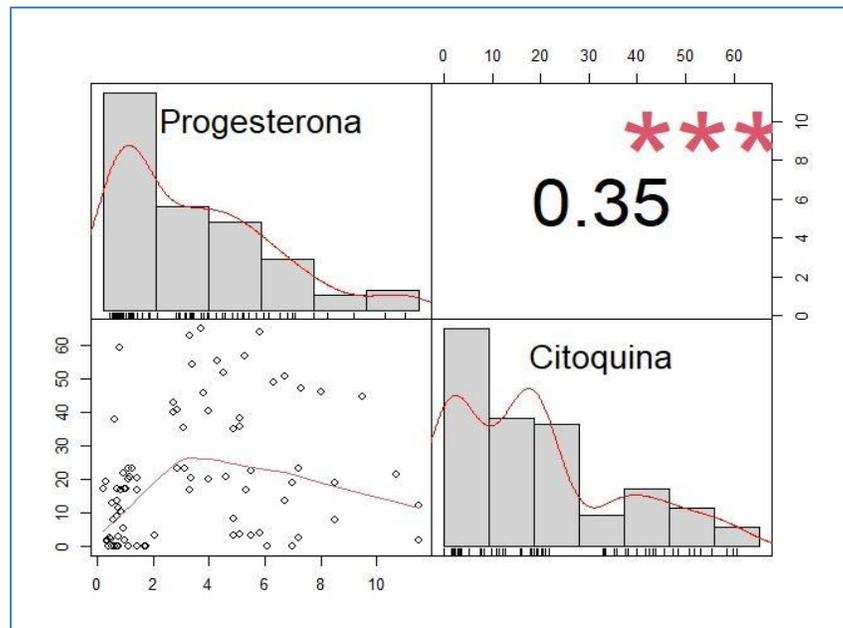


Figura 11. Correlación no lineal entre la progesterona y la IL-10 en alpacas (*Vicugna pacos*) evaluadas durante el primer mes de gestación de las alpacas ($R=0.35$; $p<0.001$).

5.8 Resultados individuales de los niveles de IL-10

Cuadro 7. Niveles séricos de IL-10 en alpacas a lo largo de los días evaluados

Grupo	animal	Días evaluados							
		D0	D12	D15	D18	D21	D24	D27	D30
G1	1	19.34	12.36	21.73	22.63	23.41	19.21	13.72	19.12
	2	96.27	45.71	62.91	54.46	64.18	57.01	49.04	40.28

	3	2.32	3.55	3.98	3.40	3.58	8.30	7.98	2.55
	4	37.82	35.66	40.35	40.76	55.64	65.19	35.81	35.19
G2	5	59.51	44.77	46.38	50.90	51.94	42.96	47.13	38.32
	6	0.00	2.05	1.77	0.00	0.00	0.00	3.41	0.00
G3	7	0.06	1.83	2.56	1.57	0.01	0.00	0.00	0.00
	8	5.46	0.00	0.00	0.00	0.00	13.67	2.09	0.00
	9	13.13	8.07	8.99	10.47	11.55	3.04	21.93	17.33
	10	320.38	395.66	507.27	713.23	675.62	411.06	272.55	177.05

Los niveles séricos de IL-10 en las alpacas del presente estudio, tuvieron variaciones en los tres grupos de alpacas, oscilando desde los 0 pg/ml hasta niveles más altos como los de 713.23 pg/ml. Además, algunos animales como el animal 3, 6, 7 y 8 fueron los animales con los niveles más bajos en la mayoría de los días evaluados. Por otra parte, el animal 10, fue el que presentó los niveles más altos a lo largo de todos los días evaluados. Así mismo, se observa que los animales del grupo 1, presentaron niveles más altos a comparación de los otros grupos a lo largo de todos los días evaluados.

5.9 Resultados individuales de los niveles de p4 desde el día 0 al día 30 (ng/ml)

Cuadro 8. Niveles séricos de P4 en alpacas a lo largo de los días evaluados

Grupo	Animal	Días evaluados							
		D0	D12	D15	D18	D21	D24	D27	D30
G1	1	0.33	11.50	10.70	5.50	7.20	7.00	6.70	8.50
	2	0.24	3.80	3.30	3.40	5.8	5.3	6.3	2.75
	3	0.5	4.9	5.8	5.5	5.1	4.9	8.5	7.2
	4	0.65	3.1	4.00	2.85	4.30	3.70	5.10	4.90
G2	5	0.82	9.50	8.00	6.70	4.50	2.75	7.30	5.10
	6	1.75	11.50	11.50	6.10	1.45	1.70	2.05	1.10
G3	7	0.55	0.37	0.45	0.37	0.41	0.76	0.70	0.55
	8	0.92	7.00	0.70	0.76	0.65	0.70	0.98	0.41

	9	0.55	0.60	0.70	0.86	0.76	0.76	0.92	0.98
	10	1.05	0.86	1.15	1.45	1.10	1.25	1.10	1.45

En cuanto a la progesterona (P4), se observó niveles adecuados según el resultado al apareamiento. Observando niveles en incremento en las hembras G1 a lo largo de los días evaluados. En cuanto al G2, también tuvo incremento a comparación del D0 pero alrededor del D18 es que empieza a descender, y que se mantuvieron superiores a 2,75 ng/ml post-apareamiento. Por otro lado, en el G3 las hembras presentaron niveles bajos de P4, a excepción de la hembra 10 que presento niveles similares a lo largo de los días evaluados, teniendo como máximo 1,45 ng/ml.

VI. Discusión

El total de hembras preñadas, el 33.33% (2/6) presentaron reabsorción embrionaria (G2) (figura 4). Si bien, se sabe que en el primer mes de gestación en alpacas las pérdidas embrionarias suelen ser de alrededor del 50% (3); también se ha reportado porcentajes menores de perdidas embrionarias, como lo observado por Bravo *et al.*, (2010) (145) en donde halló un 22% (37/167) en el primer mes de gestación.

Este trabajo describe por primera vez los niveles de IL-10 en alpacas durante el primer mes de gestación, con el objetivo de explorar la asociación de los niveles séricos de IL-10 y la reabsorción embrionaria en alpacas durante el primer mes de gestación.

A pesar de presentarse diferencias en los niveles de IL-10 entre los grupos G1, G2 y G3, no se observó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-10

entre los grupos G1 y G3 ($p>0.05$), G1 y G2 ($p>0.05$), y G2 y G3 ($p>0.05$), en ninguno de los días evaluados (0, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30). Sin embargo, los diferentes niveles de IL-10 encontrados entre los 3 grupos, se podría deber a que en el caso de las hembras G1 se encontraron preñadas y en el caso de las hembras G3 no quedaron preñadas. Por otro lado, las hembras G2 mostraron niveles de IL-10 también en ascenso como las hembras G1, pero con el pasar de los días en las hembras G2 los niveles de IL-10 empezaron a descender probablemente por la pérdida embrionaria. Esta observación en los niveles de IL-10, se sustentaría por que la IL-10 cumple un papel relevante en la fertilidad del individuo, así como en procesos importantes como la implantación del embrión y la tolerancia inmunológica materna (146); importantes para el correcto balance de la respuesta inmunológica que conlleva al éxito de la reproducción (147).

En el caso de las hembras preñadas (G1), se observó un incremento constante de los niveles de IL-10 desde el día 0 al 21 post-apareamiento, para luego empezar a descender desde el día 24 al día 27 post-apareamiento; pero, al día 30 empezó a incrementar nuevamente. Lo cual sugeriría que, el éxito de la gestación temprana en alpacas sea en parte de carácter inmunológico.

Por otro lado, el comportamiento de la IL-10 a lo largo de todos los días evaluados (0, 12, 15, 17, 21, 24, 27 y 30) de las hembras que reabsorbieron el embrión (G2), tuvo una tendencia al incremento como los niveles de IL-10 de las hembras preñadas (G1) ($p>0,05$). Cabe mencionar que en las hembras G2, probablemente fue causado por tener niveles insuficientes de IL-10 para mantener la gestación temprana como en el caso de las G1. Siendo muy diferentes los niveles entre la G1 y G2, especialmente en días

importantes como fue al D21 donde procesos como la implantación embrionaria suceden. Así mismo, a pesar de que el grupo G2 tuvo niveles similares al G1 en el día 24 al del día 27, estos fueron insuficientes para mantener viable la gestación. Además, la pérdida embrionaria desde antes del día 21 se puede confirmar con lo observado a la ecografía, donde se observó solo restos del embrión al día 21 y 24 post-apareamiento en las hembras G2, lo que confirmaría la pérdida del embrión en alpacas con niveles bajos de IL-10 comparándolo con las hembras G1.

Con respecto a los días evaluados, las alpacas de los 3 grupos presentaron ciertos niveles de IL-10 post-apareamiento (Día 0), donde las hembras G3 tuvieron medianas inferiores a los 9,29 pg/ml a diferencia del grupo G1 y G2 que presentaron 18,27 pg/ml y 17,20 pg/ml, respectivamente (cuadro 3). Esto puede sustentarse, puesto que el apareamiento de las alpacas, produce inflamación del tracto reproductivo (4), necesaria para la absorción del β -NGF (factor de crecimiento neural-beta) proveniente del plasma seminal para la ovulación (148). Esta inflamación tisular producto del apareamiento, produce sustancias químicas que promueven la migración de neutrófilos (149); su presencia suele ser corta para eliminar espermatozoides y bacterias que hayan ingresado, y así asegurar un correcto estado del endometrio para recibir al embrión (21). Adicionalmente, se ha observado que en ratones y cerdos, el plasma seminal y los espermatozoides inducen a las células del epitelio uterino a producir citoquinas proinflamatorias necesarias para el reclutamiento de macrófagos y células dendríticas que cumplen el rol de remodelar el tejido endometrial y activar la tolerancia inmunológica materna (150). Así mismo, el adecuado balance de citoquinas a nivel

del plasma seminal es necesario para proteger a los espermatozoides (151). En bovinos, se ha reportado niveles de IL-10 en plasma seminal tienen una correlación positiva con la movilidad espermática (151). Además, en llamas el plasma seminal tendría un efecto inmuno-modulador para establecer la tolerancia y desarrollo embrionario (147). Por lo que, según lo observado, en el plasma seminal de las alpacas también podrían tener componentes que promoverían la liberación sistémica de IL-10 en la hembra el día 0 del apareamiento, para así mantener esta tolerancia espermática post-apareamiento; y ello podría estimar el éxito de la fecundación y/o de la gestación.

Se puede observar que los niveles de IL-10 fueron similares al día 0 entre las hembras G1 y G2 ($p>0.05$), pero a partir del día 12 en adelante mantuvieron niveles distintos entre ambos grupos con una tendencia al incremento, sin diferencias significativas en el resto de días evaluados ($p>0.05$) (figura 9). Las hembras del G1 mantuvieron sus niveles de IL-10 en incremento a lo largo de todos los días evaluados; puesto que, dicha citoquina se expresa en la gestación para mantener un equilibrio inmunológico y tolerar al aloinjerto (114). Esta citoquina, en ratones, es producida por subpoblaciones de LB (152, 153), así como por queratinocitos y el trofoblasto (154). En cerdas preñadas, los niveles séricos de IL-10 aumentan mientras avanza la gestación, pero a nivel placentario no hay diferencias a lo largo de los días; lo cual indicaría que la IL-10 tiene un efecto del tipo sistémico más que local durante la gestación (114). Por lo cual, en las alpacas del presente estudio, también contribuiría en parte al éxito de la gestación.

Por otro parte, los niveles de IL-10 del grupo G1 presentaron un incremento continuo, teniendo los niveles más altos entre los días 21 y 24 post-apareamiento para luego descender (figura 9). Estos resultados observados podrían deberse a la implantación embrionaria que en alpacas se da entre los días 20 al 26 (49); así como lo observado en cerdas, donde la IL-10 es una citoquina que se expresa en mayor cantidad durante este proceso (114). Puesto que, la presencia de la IL-10 tiene un efecto sobre la inmunotolerancia materna (155). Las citoquinas liberadas a nivel endometrial, tienen efecto sobre el desarrollo embrionario para la implantación (150); dichas citoquinas son secretadas por las células endometriales, así como por células del sistema inmunológico presentes en el lugar de la implantación (50). En el caso de llamas, el plasma seminal tendría un efecto modulador de la respuesta inmunológica post-apareamiento, al producir citoquinas pro-inflamatorias que colaboran con la implantación embrionaria futura (147); puesto que la inflamación producida por la implantación es crucial para una adecuada receptividad endometrial al embrión (156). Por el contrario, los niveles de IL-10 en el G2 mantuvieron niveles en ascenso, pero inferiores a los del G1 (figura 9). Generando que no haya un adecuado reconocimiento y tolerancia del embrión, llevándolo a la reabsorbiendo. Por lo que es posible que la IL-10 podría tener un efecto sobre el primer mes de gestación en alpacas y más durante etapas como la implantación.

En cuanto a los resultados de IL-10 individuales de los animales, se observaron algunos animales con niveles desde 0 pg/ml hasta los 713.23 pg/ml a lo largo de los 30 días (cuadro 7). Los animales con los niveles más bajos fueron del animal N°3 (G1), N°6

(G2), N°7 y N°8 (G3). Por otro lado, ratones con restricción de la movilidad, presentaron niveles de IL-10 más bajos que el grupo control a lo largo de 28 días evaluados, y con aumento de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 e INF- γ (157). En cuanto al animal N°10 (G3), presento los niveles más altos a lo largo de los 30 días evaluados (cuadro 7). En un estudio realizado en ratones sometidos a estrés agudo y crónico, se observó que las citoquinas de tipo antiinflamatorias como la IL-4 e IL-10 subían más ante el estrés agudo que el crónico, ambos comparados con el grupo control (158). Por otro lado, la IL-4 e IL-10 promueven un ambiente antiinflamatorio como lo observado en infecciones experimentales en ratas con *F. hepatica* lo cual beneficia a la supervivencia del patógeno (159), al igual que durante la infección crónica (160); o como en infecciones por *F. gigantica* en búfalos, donde se observó una polarización de la respuesta inmune hacia Th2 durante una fase temprana y tardía de la infección (161). Por lo que es posible, que los niveles de IL-10 séricos de las alpacas del presente estudio, no solo se debieron a su estado reproductivo, sino que también puede verse influenciada otros factores, como el estrés al manejo de cada individuo o algún tipo de infección no identificada.

En relación a los niveles de progesterona (P4) entre los grupos G1 y G3 hubo diferencias significativas entre G1 y G3 ($p < 0.5$), y G2 y G3 ($p < 0.5$) a partir del día 15 hasta el día 30 (figura 10). Estas diferencias entre el G1 y G3, se puede deber a que las hembras G3 se encontraban vacías y las hembras G1 se encontraron preñadas. Y en el caso de las hembras G2 al reabsorber el embrión aun mantenían niveles de progesterona presentes, con diferencias con el grupo G3 los días 15 y 18 ($p > 0.05$). Esta presencia de

la progesterona y posible gestación se pudo comprobar con la prueba de rechazo al macho; donde las hembras G3 presentaron receptividad al macho durante los días 15 y 18 post-apareamiento (cuadro 2), indicando así que se encontrarían vacías (18). Por otro lado, probablemente las hembras no habrían ovulado puesto que los niveles de P4 fueron inferiores a 1 ng/ml lo que indicaría falla en la ovulación (162); sobre todo, si hay falta de respuesta al estímulo del macho durante el apareamiento (163).

En el día 0 los niveles de P4 tuvieron diferencia significativa entre las hembras G1 y G2 ($p < 0.05$), y no hubo diferencias entre las hembras G2 y G3, y G1 y G2 ($p > 0.05$). Donde las medianas de los niveles de P4 en los grupos evaluados, fueron superiores a 0.42 ng/ml al día 0; anteriormente se ha reportado en alpacas, niveles de P4 de 0,009 ng/ml (162) y de 0,1442 ng/ml (164) el mismo día del apareamiento, o niveles basales de P4 que van desde los 0,1 a 0,3 ng/ml (165). Incluso en alpacas no preñadas pueden presentar niveles desde 0,2 a 2,0 ng/ml (144). Por otro lado, en el caso de las hembras N°6 (G2) y N°10 (G3), presentaron niveles de P4 de 1,75 ng/ml y de 1,05 ng/ml el mismo día del apareamiento respectivamente. Además, la hembra N°10 llegó a tener niveles de hasta 1,45 ng/ml a pesar de encontrarse sin preñez, sin alterar su comportamiento al no rechazar al macho. En otras especies como camellos sin preñez, pueden presentar 0 ng/ml a 1,51 ng/ml de P4; además, se observó que los niveles de P4 fueron superiores en los animales más adultos que los jóvenes (166), coincidiendo con lo observado en el presente estudio.

Se hallaron diferencias significativas en los niveles de P4 entre las hembras preñadas (G1) y las hembras vacías (G3) a partir del día 15 hasta el día 30 ($p < 0.05$); así mismo, solo hubo diferencias significativas entre las hembras que reabsorbieron el embrión (G2) y hembras vacías (G3), en los días 15 y 18 ($p < 0.05$). Las hembras G1 mantuvieron un aumento progresivo de los niveles de P4, entre los días 12 al 30 post-apareamiento, siendo superiores a 4 ng/ml y 6 ng/ml respectivamente con fluctuaciones de los niveles entre esos días. Se ha reportado que en alpacas preñadas entre los días 8 y 30 post apareamiento, tienen niveles de P4 de 3,55 ng/ml y 5,01 ng/ml respectivamente (162) o de 3,6 ng/ml o 3,74 ng/ml entre los días 12 al 25 respectivamente (164). Las fluctuaciones observadas en el presente trabajo, iban desde un ligero descenso entre dichos días para luego seguir aumentando. Estas fluctuaciones de P4, anteriormente han sido reportadas en alpacas preñadas (164). Es razonable pensar que, a pesar de las fluctuaciones de los niveles de P4, estos niveles son suficientes para mantener la preñez en el primer mes de gestación en alpacas. Sin embargo, en las hembras G2, estas presentaron niveles > 7 ng/ml de P4 al día 12, teniendo un descenso brusco hasta el día 21 (3,12 ng/ml) para seguir descendiendo de manera fluctuante el resto de días evaluados. Se ha reportado que en alpacas no preñadas, al día 8 pueden presentar niveles de 3,47 ng/ml de P4, con caída de los niveles al día 10 y 11 post apareamiento (162). Si bien, los niveles de P4 de 1,25 ng/ml entre los días 9 al 30 post apareamiento podrían indicar gestación (162); también podría tratarse de un cuerpo lúteo aún funcional, donde puede producir P4 (> 1 ng/ml) a pesar de la pérdida del embrión (167).

En las hembras G2, se observó los días 15 y 18 post-apareamiento presentaron rechazo al macho; esta conducta es observable después de la ovulación y se vuelve más intensa en las primeras semanas de gestación (168). Dicha conducta de rechazo al macho (escupir, patear o huir) es debido a niveles altos de progesterona, evidenciando la ovulación y la formación de cuerpo lúteo (CL) después del apareamiento; así como, por folículos luteinizados hemorrágicos o anovulatorios que producen P4 (168), o que contaban con un CL en regresión después de la pérdida embrionaria (18). Esta conducta de rechazo al macho, coincidiendo con las días en que hubo diferencias significativas entre los niveles de P4 entre G2 y G3 al día 15 y 18 ($p < 0.05$). Lo cual indicaría, gestación y pérdida embrionaria en las hembras G2, lo cual se confirmaría con los restos del embrión detectados a la ecografía los días 21 y 24 post-apareamiento. Algo a tener en cuenta, es que la pérdida embrionaria puede manifestarse antes, después o junto con el descenso de la progesterona en circulación periférica (145). Puesto que, no existe relación entre los niveles de progesterona a nivel periférico y la circulación ovario-uterina, dependiendo de esta última la sobrevivencia embrionaria en camélidos (169).

Estas hembras G2, presentaron restos del embrión a la ecografía entre el día 21 y 24, y reducción de la P4 entre los días 18 al 21, por lo que es factible asumir que perdieron el embrión antes del día 21. Concordando con lo reportado en alpacas, donde se menciona que las pérdidas embrionarias pueden ser entre los días 12 al 27 post apareamiento (145). Y este descenso de la progesterona en G2 coincide con lo observado por Echevarría *et al.*, 2010 (167), donde menciona que al día 19 de gestación

se da la pérdida embrionaria en alpacas, a pesar de niveles de P4 de 3.4 ng/ml. Siendo factible asumir que, días anteriores al día 21 serían claves para prevenir las pérdidas embrionarias.

Adicionalmente, este trabajo presenta por primera vez la correlación positiva existente entre los niveles de IL-10 y de P4 durante el primer mes de gestación en alpacas de manera significativa ($P < 0,05$) (figura 11). Se ha observado en el presente trabajo que, en las hembras G1 y G2 los niveles de P4 al igual que la IL-10 se mantuvieron en un aumento progresivo a lo largo de los 30 días post-apareamiento, y en las hembras G3 bajos. Esto podría deberse a las hembras G3 no preñaron por lo cual dichos niveles de P4 y por ende de IL-10 no presentaron semejanzas a los otros grupos. Dado que, la P4 juega un papel importante en las primeras etapas de la gestación al establecer una respuesta inmunológica adecuada para su establecimiento (170); así mismo, contribuye en la diferenciación de LT a LTh 2, que a su vez producirá citoquinas necesarias para crear un adecuado microambiente (171).

La P4 tiene un efecto positivo sobre células del sistema inmunológico, estimulando a los linfocitos a la liberación de citoquinas antiinflamatorias como la IL-3, IL-4 e IL-10, reduciendo así la expresión de citoquinas pro inflamatorias como INF- δ , TNF- α e IL-2 (128). Además, la P4 e IL-10 trabajan en conjunto para bloquear las respuestas pro inflamatorias y mejorar la regulación de la unión con la decidua (172); coincidiendo a su vez con lo observado en llamas durante la fase lútea, en la que no existe presencia de células inflamatorias en fluido uterino (147).

Por lo que, se podría suponer que en alpacas la producción de P4 tendría un efecto sobre la producción de IL-10, necesario para el mantenimiento de la gestación.

El presente estudio exploratorio conto con algunas limitaciones como: Los kits de ELISA y RIA no eran especie específica, por lo cual su sensibilidad pudo ser variable; sin embargo, estos han sido aplicados en diferentes trabajos de investigación que validarían su aplicación para esta especie. Además, al ser el presente trabajo de tipo exploratorio, el número de animales utilizados por grupo fue limitado, generando que el análisis por grupos y los días no muestren significancia; por lo que la alta variabilidad de los resultados estaría asociada a los números de ejemplares muestreados. Otro aspecto importante, fue la evaluación de salud de los animales que se realizó de forma clínica, por lo que podría haber factores no evaluados relacionados a la condición de salud, que afectan la variabilidad de los resultados individuales.

VII. Conclusiones

- Si bien existen indicios de asociación entre los niveles séricos de IL-10 y la reabsorción embrionaria en alpacas durante primer mes de gestación; no se halló diferencia significativa entre las hembras preñadas, las que reabsorbieron el embrión y las hembras no preñadas en relación a los niveles de IL-10 y los días evaluados (0, 12, 15, 17, 21, 24, 30 post-apareamiento) ($p > 0.05$). Sin embargo, los niveles de IL-10 en alpacas preñadas fueron superiores a las que reabsorbieron el embrión en los días evaluados (0, 12, 15, 17, 21, 24, 30 post-apareamiento).

- Los niveles séricos de IL-10 el día del apareamiento (D0) fueron superiores en las alpacas preñadas y las que reabsorbieron el embrión, a diferencia de las alpacas que no quedaron preñadas ($p>0.05$).
- Los niveles de Progesterona el día del apareamiento (D0), presento una diferencia significativa entre las hembras preñadas y las hembras que reabsorbieron el embrión ($p<0.05$).
- Los niveles de Progesterona al día 15 y día 18, presento diferencias significativas entre las hembras preñadas y hembras no preñadas ($p<0.05$), y entre las hembras que reabsorbieron y hembras vacías ($p<0.05$).
- Los días 21, 24, 27 y 30 post-apareamiento existe diferencias significativas en los niveles de Progesterona entre hembras preñadas (G1) y las hembras no preñadas ($p<0.05$).
- Los niveles séricos de IL-10 y de Progesterona tienen una correlación no lineal positiva de tipo significativa ($p<0.001$) en alpacas (*Vicugna pacos*).

VIII. Recomendaciones

- Dado que los valores evaluados indica relación de citoquinas como la IL-10 y la reabsorción embrionaria en alpacas, se recomienda realizar más estudios sobre el comportamiento de las citoquinas durante la etapa embrionaria en alpacas.
- Se sugiere realizar investigaciones adicionales con una muestra más amplia para confirmar la relación entre IL-10 y la reabsorción embrionaria.
- Se recomienda evaluar la dinámica de los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias durante el primer mes de gestación.

IX. Referencias bibliográficas:

1. INEI. IV Censo Nacional Agropecuario. Perú2012.
2. ESTUDIO F. Producción y Sanidad animal, Manual de Practicas de Manejo de Alpacas y Llamas. VIALLE DELLE TERME DI CARACALLA. 1996:92-5.
3. Fernandez-Baca S, Hansel W, Novoa C. Embryonic mortality in the alpaca. *Biology of Reproduction*. 1970;3(2):243-51.
4. Ciccarelli M. Effect of exogenous oxytocin on alpaca luteal function: Washington State University; 2017.
5. Hashem N, Soltan Y, editors. Early embryonic loss in farm animals: causes and solutions. 3rd international conference" sustainable development of livestock production systems" Alexandria, Egypt: animal and fish production department; 2017: Faculty of Agriculture, Alexandria University.
6. Ozen M, Novak C, Burd I. Placenta immune infiltrates and perinatal outcomes. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018;79(5):e12850.
7. Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. *Frontiers in immunology*. 2014;5:253.
8. Gnainsky Y, Granot I, Aldo PB, Barash A, Or Y, Schechtman E, et al. Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertility and sterility*. 2010;94(6):2030-6.
9. Nasu K, Narahara H, Matsui N, Kawano Y, Tanaka Y, Miyakawa I. Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Molecular human reproduction*. 1999;5(6):548-53.
10. Plevyak M, Hanna N, Mayer S, Murphy S, Pinar H, Fast L, et al. Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. *American journal of reproductive immunology*. 2002;47(4):242-50.
11. Gregory GD, Raju SS, Winandy S, Brown MA. Mast cell IL-4 expression is regulated by Ikaros and influences encephalitogenic Th1 responses in EAE. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(5):1327-36.
12. Figarska A, Domino M, Maško M, Witkowska-Piłaszewicz O. Serum Cytokine Reactions during Pregnancy in Healthy Mares. *Agriculture*. 2023;13(2):331.
13. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature medicine*. 2012;18(12):1754-67.
14. King AE, Critchley HO. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;120(2-3):116-26.
15. Fernández-Baca S. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. 1991.
16. Zarrin M, Riveros JL, Ahmadpour A, de Almeida AM, Konuspayeva G, Vargas-Bello-Pérez E, et al. Camelids: new players in the international animal production context. *Tropical Animal Health and Production*. 2020;52:903-13.
17. Novoa C FA. Producción de Rumiantes menores. Perú: INIA; 1991.
18. Sumar J, García M. Fisiología de la reproducción de la alpaca. Nuclear and related techniques in animal production and health: IAEA, Vienna; 1986. p. 149-77.

19. Cárdenas O, Ratto M, Cordero A, Huanca W. Determinación de la fertilidad en llamas con un servicio, mediante conducta sexual y ecografía. *Rev Inv Vet Peru*. 2001;467-9.
20. Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3(1):1-5.
21. Katila T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reproduction in domestic animals*. 2012;47:31-41.
22. Alghamdi AS, Foster DN. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biology of reproduction*. 2005;73(6):1174-81.
23. Doty A, Buhi W, Benson S, Scoggin K, Pozor M, Macpherson M, et al. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. *Biology of reproduction*. 2011;85(1):157-64.
24. Hansen P. The immunology of early pregnancy in farm animals. *Reproduction in domestic animals*. 2011;46:18-30.
25. Sánchez JM, Mathew DJ, Passaro C, Fair T, Lonergan P. Embryonic maternal interaction in cattle and its relationship with fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 2018;53:20-7.
26. Campanile G, Baruselli PS, Limone A, Michael J. Local action of cytokines and immune cells in communication between the conceptus and uterus during the critical period of early embryo development, attachment and implantation—Implications for embryo survival in cattle: A review. *Theriogenology*. 2021;167:1-12.
27. Imakawa K, Bai R, Kusama K. Integration of molecules to construct the processes of conceptus implantation to the maternal endometrium. *Journal of Animal Science*. 2018;96(7):3009-21.
28. Picha Y, Tibary A, Memon M, Kasimanickam R, Sumar J. Chronology of early embryonic development and embryo uterine migration in alpacas. *Theriogenology*. 2013;79(4):702-8.
29. Aba MA, Kindahl H, Forsberg M, Quiroga M, Auza N. Levels of progesterone and changes in prostaglandin F₂ α release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Animal Reproduction Science*. 2000;59(1-2):87-97.
30. Powell SA, Smith BB, Timm KI, Menino Jr AR. Estradiol production by preimplantation blastocysts and increased serum progesterone following estradiol treatment in llamas. *Animal reproduction science*. 2007;102(1-2):66-75.
31. Skidmore J, Allen W, Heap R. Oestrogen synthesis by the peri-implantation conceptus of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Reproduction*. 1994;101(2):363-7.
32. Chipayo Y, Leyva V, García W. Efecto del estradiol en el periodo de reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2003;14(2):111-8.
33. Bazer FW, Johnson GA. Pig blastocyst–uterine interactions. *Differentiation*. 2014;87(1-2):52-65.
34. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, Palmarini M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction, fertility and development*. 2006;19(1):65-78.

35. Forde N, Lonergan P. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: what is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? *Journal of Reproduction and Development*. 2012;58(2):189-95.
36. Antoniazzi AQ, Webb BT, Romero JJ, Ashley RL, Smirnova NP, Henkes LE, et al. Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F₂ alpha-induced luteolysis in ewes. *Biology of reproduction*. 2013;88(6):144, 1-12.
37. Rocha CC, Silveira Jc, Forde N, Binelli M, Pugliesi G. Conceptus-modulated innate immune function during early pregnancy in ruminants: a review. *Animal Reproduction*. 2021;18:e20200048.
38. Spencer T, Johnson G, Bazer F, Burghardt R. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 2007;64:379-96.
39. Kölle S, Hughes B, Steele H. Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review. *Molecular reproduction and development*. 2020;87(6):650-62.
40. Talukder AK, Rashid MB, Yousef MS, Kusama K, Shimizu T, Shimada M, et al. Oviduct epithelium induces interferon-tau in bovine Day-4 embryos, which generates an anti-inflammatory response in immune cells. *Scientific Reports*. 2018;8(1):7850.
41. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, editors. *Interferons and uterine receptivity*. Seminars in reproductive medicine; 2009: © Thieme Medical Publishers.
42. D'Occhio MJ, Campanile G, Baruselli PS. Transforming growth factor- β superfamily and interferon- τ in ovarian function and embryo development in female cattle: review of biology and application. *Reproduction, Fertility and Development*. 2020;32(6):539-52.
43. Hansen TR, Sinedino LD, Spencer TE. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). *Reproduction*. 2017;154(5):F45-F59.
44. Skidmore J, Starbuck G, Lamming G, Allen W. Control of luteolysis in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Reproduction*. 1998;114(2):201-9.
45. Trasorras V, Chaves MG, Neild D, Gambarotta M, Aba M, Agüero A. Embryo transfer technique: factors affecting the viability of the corpus luteum in llamas. *Animal reproduction science*. 2010;121(3-4):279-85.
46. Fernandez-Baca S, Hansel W, Saatman R, Sumar J, Novoa C. Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. *Biology of Reproduction*. 1979;20(3):586-95.
47. Sumar J. Removal of the ovaries or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*. 1988;83:133-41.
48. Bonacic C. Características biológicas y productivas de los camélidos sudamericanos. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 1991;6(2).
49. Olivera L, Zago D, Jones C, Bevilacqua E. Developmental changes at the materno-embryonic interface in early pregnancy of the alpaca, Lamos pacos. *Anatomy and embryology*. 2003;207:317-31.
50. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Racicot K, Mor G. The role of inflammation for a successful implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2014;72(2):141-7.
51. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(3):185-99.
52. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reproductive biomedicine online*. 2003;7(2):151-61.

53. Flores LE, Hildebrandt TB, Kühl AA, Drews B. Early detection and staging of spontaneous embryo resorption by ultrasound biomicroscopy in murine pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):1-12.
54. Paria B, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*. 2002;296(5576):2185-8.
55. Bai R, Kusama K, Sakurai T, Bai H, Wang C, Zhang J, et al. The role of endometrial selectins and their ligands on bovine conceptus attachment to the uterine epithelium during peri-implantation period. *Biology of reproduction*. 2015;93(2):46, 1-11.
56. Gibreel A, Badawy A, El-Refai W, El-Adawi N. Endometrial scratching to improve pregnancy rate in couples with unexplained subfertility: a randomized controlled trial. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2013;39(3):680-4.
57. Granot I, Gnainsky Y, Dekel N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction*. 2012;144(6):661-8.
58. Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL. Two unique human decidual macrophage populations. *The Journal of Immunology*. 2011;186(4):2633-42.
59. Miyazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y, Futatani T, et al. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Journal of Leucocyte Biology*. 2003;74(4):514-22.
60. Nagamatsu T, Schust DJ. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *American journal of reproductive immunology*. 2010;63(6):460-71.
61. Plaks V, Birnberg T, Berkutzi T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(12):3954-65.
62. Vasudevan S, Kamat MM, Walusimbi SS, Pate JL, Ott TL. Effects of early pregnancy on uterine lymphocytes and endometrial expression of immune-regulatory molecules in dairy heifers. *Biology of reproduction*. 2017;97(1):104-18.
63. Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(43):15563-8.
64. Germeyer A, Sharkey AM, Prasadajudio M, Sherwin R, Moffett A, Bieback K, et al. Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts. *Molecular human reproduction*. 2009;15(1):39-48.
65. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature medicine*. 2006;12(9):1065-74.
66. Blois SM, Klapp BF, Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. *Journal of reproductive immunology*. 2011;88(2):86-92.
67. Kwak-Kim J, Park JC, Ahn HK, Kim JW, Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss. *American journal of reproductive immunology*. 2010;63(6):611-23.
68. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biology of reproduction*. 2009;80(5):848-59.
69. Tayade C, Fang Y, Hilchie D, Croy BA. Lymphocyte contributions to altered endometrial angiogenesis during early and midgestation fetal loss. *Journal of Leucocyte Biology*. 2007;82(4):877-86.

70. Jensen F, Woudwyk M, Teles A, Woidacki K, Taran F, Costa S, et al. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PLoS one*. 2010;5(12):e14409.
71. Kamat MM, Vasudevan S, Maalouf SA, Townson DH, Pate JL, Ott TL. Changes in myeloid lineage cells in the uterus and peripheral blood of dairy heifers during early pregnancy. *Biology of reproduction*. 2016;95(3):68, 1-12.
72. Okeke EB, Uzonna JE. The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells. *Frontiers in immunology*. 2019;10:680.
73. Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martín JC, Remohí J, et al. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biology of reproduction*. 2001;64(2):590-601.
74. Gipson IK, Blalock T, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Allcorn S, Stavreus-Evers A, Gemzell K. MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biology of reproduction*. 2008;78(1):134-42.
75. Singh H, Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *Journal of anatomy*. 2009;215(1):3-13.
76. Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*. 2003;299(5605):405-8.
77. Wang B, Sheng JZ, He RH, Qian YL, Jin F, Huang HF. High expression of L-selectin ligand in secretory endometrium is associated with better endometrial receptivity and facilitates embryo implantation in human being. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008;60(2):127-34.
78. Liu S, Yang X, Liu Y, Wang X, Yan Q. sLeX/L-selectin mediates adhesion in vitro implantation model. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;350:185-92.
79. Michael DD, Alvarez IM, Ocón OM, Powell AM, Talbot NC, Johnson SE, Ealy AD. Fibroblast growth factor-2 is expressed by the bovine uterus and stimulates interferon- τ production in bovine trophectoderm. *Endocrinology*. 2006;147(7):3571-9.
80. Taniguchi F, Harada T, Yoshida S, Iwabe T, Onohara Y, Tanikawa M, Terakawa N. Paracrine effects of bFGF and KGF on the process of mouse blastocyst implantation. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 1998;50(1):54-62.
81. Bai R, Bai H, Kuse M, Ideta A, Aoyagi Y, Fujiwara H, et al. Involvement of VCAM1 in the bovine conceptus adhesion to the uterine endometrium. *Reproduction*. 2014;148(2):119-27.
82. Yamakoshi S, Bai R, Chaen T, Ideta A, Aoyagi Y, Sakurai T, et al. Expression of mesenchymal-related genes by the bovine trophectoderm following conceptus attachment to the endometrial epithelium. *Reproduction*. 2012;143(3):377.
83. Ramadan A, Johnson III G, Lewis G. Regulation of uterine immune function during the estrous cycle and in response to infectious bacteria in sheep. *Journal of animal Science*. 1997;75(6):1621-32.
84. Liu W-J, Hansen PJ. Effect of the progesterone-induced serpin-like proteins of the sheep endometrium on natural-killer cell activity in sheep and mice. *Biology of reproduction*. 1993;49(5):1008-14.

85. Marocho LO. Histological characterization of the utero-placental membranes of alpaca. *Latin American Archives of Animal Production*. 2007;15(5).
86. Rodriguez-Martinez H, McKenna D, Weston P, Whitmore H, Gustafsson B. Uterine motility in the cow during the estrous cycle. I. Spontaneous activity. *Theriogenology*. 1987;27(2):337-48.
87. Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *American journal of reproductive immunology*. 2005;53(2):65-76.
88. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*. 2007;37(S1):S34-S45.
89. Par G, Geli J, Kozma N, Varga P, Szekeres-Bartho J. Progesterone regulates IL12 expression in pregnancy lymphocytes by inhibiting phospholipase A2. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2003;49(1):1-5.
90. Dealtry GB, Clark DE, Sharkey A, CHARNOCK-JONES DS, Smith SK. Expression and localization of the Th2-type cytokine interleukin-13 and its receptor in the placenta during human pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1998;40(4):283-90.
91. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*. 1996;17(3):138-46.
92. Borgatti M, Rizzo R, Canto MBD, Fumagalli D, Renzini MM, Fadini R, et al. Release of sICAM-1 in oocytes and in vitro fertilized human embryos. *PLoS One*. 2008;3(12):e3970.
93. Prins JR, Gomez-Lopez N, Robertson SA. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *Journal of reproductive immunology*. 2012;95(1-2):1-14.
94. Ott TL, Gifford CA. Effects of early conceptus signals on circulating immune cells: lessons from domestic ruminants. *American journal of reproductive immunology*. 2010;64(4):245-54.
95. Ott TL. Immunological detection of pregnancy: Evidence for systemic immune modulation during early pregnancy in ruminants. *Theriogenology*. 2020;150:498-503.
96. Vélez C, Clazure M, Williamson D, Koncurat MA, Santa-Coloma TA, Barbeito C. IL-1 β , IL-2 and IL-4 concentration during porcine gestation. *Theriogenology*. 2019;128:133-9.
97. Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, et al. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(4):507-17.
98. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul W. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine*. 1990;172(3):921-9.
99. Croft M, Swain SL. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1995;154(9):4269-82.
100. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology*. 1999;17(1):701-38.
101. Shimoda K, van Deursent J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted State6 gene. *Nature*. 1996;380(6575):630-3.
102. Wang H, Wang L-L, Zhao S-J, Lin X-X, Liao A-H. IL-10: A bridge between immune cells and metabolism during pregnancy. *Journal of reproductive immunology*. 2022;154:103750.

103. Cheng SB, Sharma S. Interleukin-10: a pleiotropic regulator in pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015;73(6):487-500.
104. Thaxton JE, Sharma S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010;63(6):482-91.
105. Saraiva M, O'garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews immunology*. 2010;10(3):170-81.
106. Harmon A, Cornelius D, Amaral L, Paige A, Herse F, Ibrahim T, et al. IL-10 supplementation increases Tregs and decreases hypertension in the RUPP rat model of preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*. 2015;34(3):291-306.
107. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001;19(1):683-765.
108. Jensen F, Muzzio D, Soldati R, Fest S, Zenclussen AC. Regulatory B10 cells restore pregnancy tolerance in a mouse model. *Biology of reproduction*. 2013;89(4):90, 1-7.
109. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann T. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine*. 1989;170(6):2081-95.
110. Piccinni M-P, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature medicine*. 1998;4(9):1020-4.
111. Dibble S, Andersen A, Lassen MR, Cunanan J, Hoppensteadt D, Fareed J. Inflammatory and Procoagulant Cytokine Levels During Pregnancy as Predictors of Adverse Obstetrical Complications. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2014;20(2):152-8.
112. Lidström C, Matthiesen L, Berg G, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. *American journal of reproductive immunology*. 2003;50(6):444-52.
113. Fan D-X, Duan J, Li M-Q, Xu B, Li D-J, Jin L-P. The decidual gamma-delta T cells up-regulate the biological functions of trophoblasts via IL-10 secretion in early human pregnancy. *Clinical immunology*. 2011;141(3):284-92.
114. Velez C, Clauzure M, Williamson D, Koncurat MA, Barbeito C. IFN- γ and IL-10: seric and placental profile during pig gestation. *Seric and placental cytokines in pig gestation. Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2023;95:e20201160.
115. Makris A, Xu B, Yu B, Thornton C, Hennessy A. Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL10 promoter polymorphism. *Placenta*. 2006;27(4-5):445-51.
116. Brogin Moreli J, Cirino Ruocco AM, Vernini JM, Rudge MVC, Calderon IMP. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *International Scholarly Research Notices*. 2012;2012(1):230742.
117. Moreli JB, Corrêa-Silva S, Damasceno DC, Sinzato YK, Lorenzon-Ojea AR, Borbely AU, et al. Changes in the TNF-alpha/IL-10 ratio in hyperglycemia-associated pregnancies. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2015;107(3):362-9.
118. Jawerbaum A, White V. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocrine Reviews*. 2010;31(5):680-701.
119. Thaxton JE, Romero R, Sharma S. TLR9 activation coupled to IL-10 deficiency induces adverse pregnancy outcomes. *The Journal of Immunology*. 2009;183(2):1144-54.

120. Murphy SP, Fast LD, Hanna NN, Sharma S. Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *The Journal of Immunology*. 2005;175(6):4084-90.
121. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annual review of immunology*. 2013;31(1):387-411.
122. Wang X-Q, Zhou W-J, Hou X-X, Fu Q, Li D-J. Trophoblast-derived CXCL16 induces M2 macrophage polarization that in turn inactivates NK cells at the maternal–fetal interface. *Cellular & Molecular Immunology*. 2018;15(12):1038-46.
123. Matsuzaki J, Tsuji T, Imazeki I, Ikeda H, Nishimura T. Immunosteroid as a regulator for Th1/Th2 balance: its possible role in autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2005;38(5):369-75.
124. Lahita RG. Sex hormones and the immune system—Part 1. Human data. *Baillière's clinical rheumatology*. 1990;4(1):1-12.
125. Ahmed SA, Talal N. Sex hormones and the immune system—part 2. Animal data. *Baillière's clinical rheumatology*. 1990;4(1):13-31.
126. Piccinni M-P, Giudizi M-G, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1995;155(1):128-33.
127. Miyaura H, Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *The Journal of Immunology*. 2002;168(3):1087-94.
128. Druckmann R, Druckmann M-A. Progesterone and the immunology of pregnancy. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005;97(5):389-96.
129. Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1996;156(2):644-52.
130. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott J, Elliot J, et al. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1995;154(9):4261-8.
131. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(24):11408-12.
132. Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Polgar B, Par G, Faust Z, Palkovics T, Szere day L. The role of γ/δ T cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy: a review. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1999;42(1):44-8.
133. Hashem N, El-Azrak K, El-Din AN, Taha T, Salem M. Effect of GnRH treatment on ovarian activity and reproductive performance of low-prolific Rahmani ewes. *Theriogenology*. 2015;83(2):192-8.
134. Geary T, Smith M, MacNeil M, Day M, Bridges G, Perry G, et al. Triennial Reproduction Symposium: influence of follicular characteristics at ovulation on early embryonic survival. *Journal of animal science*. 2013;91(7):3014-21.
135. Kwak-Kim J, Bao S, Lee SK, Kim JW, Gilman-Sachs A. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *American journal of reproductive immunology*. 2014;72(2):129-40.

136. Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann Tea, Guilbert L. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta*. 1994;15(8):819-35.
137. Yui J, Hemmings D, Garcia-Lloret M, Guilbert LJ. Expression of the human p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in primary villous trophoblasts and their role in cytotoxic signal transduction. *Biology of reproduction*. 1996;55(2):400-9.
138. Tayade C, Black GP, Fang Y, Croy BA. Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *The Journal of Immunology*. 2006;176(1):148-56.
139. Casazza RL, Lazear HM. Why is IFN- λ less inflammatory? One IRF decides. *Immunity*. 2019;51(3):415-7.
140. Araínga M, Leyva V, García W, Franco LI E. Efecto de la GnRH en el proceso del reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2003;14(2):104-10.
141. Walter Bravo P, Fowler ME, Lasley BL. The postpartum llama: fertility after parturition. *Biology of reproduction*. 1994;51(6):1084-7.
142. Odbileg R, Purevtseren B, Batsukh Z, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. Complete cDNA sequences and phylogenetic analyses of the Th1 and Th2 cytokines of the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Veterinary Medical Science*. 2006;68(9):941-6.
143. El-Boshy M, Abbas H, El-Khodery S, Osman S. Cytokine response and clinicopathological findings in *Brucella* infected camels (*Camelus dromedarius*). *Veterinarni Medicina*. 2009;54(1):25-32.
144. Fecteau K, Giori L, Eiler H, Esteller-Vico A, Lear A, Videla R. Serum steroid and thyroid hormone concentrations in healthy domestic male and female alpacas. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023;10.
145. Bravo PW, Diaz D, Alarcón V, Ordoñez C. Effect of the reproductive state of female alpacas on embryonic mortality rate. *American journal of veterinary research*. 2010;71(9):1096-9.
146. Viganò P, Somigliana E, Mangioni S, Vignali M, Vignali M, Di Blasio AM. Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(12):5730-6.
147. Hidalgo AI, Ulloa-Leal C, Gajardo G, López G, Carretta D, Burgos RA, Ratto M. Ovulation Induced by Intrauterine Seminal Plasma Increases Total Protein, PGE2, IL-8, and IL-1 β in Uterine Fluid of Llamas (*Lama glama*). *Animals*. 2023;13(4):554.
148. Berland MA, Ulloa-Leal C, Barría M, Wright H, Dissen GA, Silva ME, et al. Seminal plasma induces ovulation in llamas in the absence of a copulatory stimulus: role of nerve growth factor as an ovulation-inducing factor. *Endocrinology*. 2016;157(8):3224-32.
149. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in immunology*. 2003;24(1):25-9.
150. Robertson S. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *Journal of Animal Science*. 2007;85(suppl_13):E36-E44.
151. Vera O, Vásquez LA, Muñoz MG. Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates. *Theriogenology*. 2003;60(3):553-8.

152. Bommer I, Muzzio DO, Zygmunt M, Jensen F. Progesterone and estradiol exert an inhibitory effect on the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 by activated MZ B cells. *Journal of reproductive immunology*. 2016;116:113-6.
153. DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1183(1):38-57.
154. Roth I, Corry D, Locksley R, Abrams J, Litton M, Fisher S. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *Journal of Reproductive Immunology*. 1997;2(33):179.
155. Risvanli A, Godekmerdan A. The effects of post-mating administration of anti-IL-10 and anti-TGF β on conception rates in mice. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2015;9(1):65.
156. Holmberg JC, Haddad S, Wünsche V, Yang Y, Aldo PB, Gnainsky Y, et al. An in vitro model for the study of human implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2012;67(2):169-78.
157. Voorhees JL, Tarr AJ, Wohleb ES, Godbout JP, Mo X, Sheridan JF, et al. Prolonged restraint stress increases IL-6, reduces IL-10, and causes persistent depressive-like behavior that is reversed by recombinant IL-10. *PloS one*. 2013;8(3):e58488.
158. Himmerich H, Fischer J, Bauer K, Kirkby KC, Sack U, Krügel U. Stress-induced cytokine changes in rats. *European cytokine network*. 2013;24(2):97-103.
159. Cervi L, Cejas H, Masih DT. Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. *International journal for parasitology*. 2001;31(13):1467-73.
160. Gironènes N, Valero MA, García-Bodelón MA, Chico-Calero I, Punzón C, Presno M, Mas-Coma S. Immune suppression in advanced chronic fascioliasis: an experimental study in a rat model. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(10):1504-12.
161. Zhang F-K, Guo A-J, Hou J-L, Sun M-M, Sheng Z-A, Zhang X-X, et al. Serum levels of cytokines in water buffaloes experimentally infected with *Fasciola gigantica*. *Veterinary parasitology*. 2017;244:97-101.
162. Sumar J, Alarcón V, Echevarría L. Niveles de progesterona periférica en alpacas y llamas y su aplicación en el diagnóstico precoz de gestación y otros usos clínicos. *Acta andin*. 1993:161-7.
163. Leyva V, García W. Efecto de la progesterona exógena y endógena en alpacas en celo sobre la ovulación, fertilización y gestación. *Res II Cong Mund Camélidos Cusco* p. 1999;89.
164. Aba M, Forsberg M, Kindahl H, Sumar J, Edqvist L-E. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1995;36(4):489.
165. Cotton T. Reproductive hormones in camelids. *NAVC Conference2008*. p. 290-3.
166. Kamoun M, Jemmali B. Serum progesterone level of camel (*Camelus dromedarius*) according to the physiological status. *Journal of New Sciences*. 2014.
167. Echevarría L, Mendoza G, Delgado A, Evaristo R. Progesterone levels in the ovarian, uterine, and systemic venous blood in alpacas with embryo mortality. Edited by NE Odongo, M Garcia & GJ Viljoen. 2010:209.
168. Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van Saun RJ, Johnson LW. *Llama and alpaca care: Medicine, surgery, reproduction, nutrition, and herd health: Elsevier Health Sciences; 2013.*

169. Boland M, Lonergan P, O'callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*. 2001;55(6):1323-40.
170. Schindler A. Immunology and progestins in pregnancy. *Gynecological Endocrinology*. 1999;13(sup4):47-50.
171. Aschkenazi S, Naftolin F, Mor G. Menopause, sex hormones and the immune system. *Menopause Management*. 2000;9(6).
172. Choi BC, Polgar K, Xiao L, Hill JA. Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction*. 2000;15(suppl_1):46-59.