



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRIA EN GANADERIA ANDINA



**EFFECTO DE LA OXITOCINA Y LA GnRH SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS SEMINALES Y TESTOSTERONA
SERICA EN ALPACAS MACHOS**

TESIS

PRESENTADO POR:

JOEL IVÁN PACHECO CURIE

PARA OPTAR EL GRADO ACADEMICO DE:

MAGISTER SCIENTIAE



PUNO - PERÚ
2011

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO	
BIBLIOTECA CENTRAL	
AREA DE TECNOLOGIA	
Fecha ingreso:	13 OCT 2014
Nº	100692

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA EN GANADERÍA ANDINA

EFFECTO DE LA OXITOCINA Y LA GnRH SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS
SEMINALES Y TESTOSTERONA SERICA EN ALPACAS MACHOS

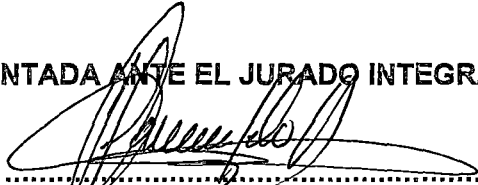
TESIS

PRESENTADA PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:


MAGÍSTER SCIENTIAE EN GANADERIA ANDINA
ESPECIALIDAD DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTADA ANTE EL JURADO INTEGRADO POR:

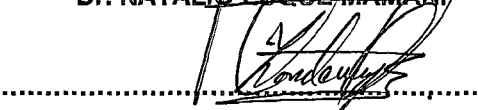
PRESIDENTE


.....
Dr. MÁXIMO MELO ANCASI

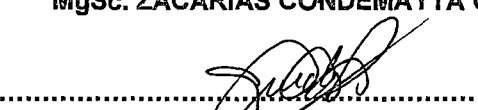
PRIMER MIEMBRO


.....
Dr. NATALIO LIQUE MAMANI

SEGUNDO MIEMBRO


.....
MgSc. ZACARIAS CONDE MAYTA CONDE MAYTA

ASESOR


.....
Dr. MANUEL GUIDO PEREZ DURAND

COASESORES

.....
Dr. TEODOSIO HUANCA MAMANI

.....
Mg. ALEXEI SANTIANI ACOSTA

AGRADECIMIENTOS

- A La Maestría en Ganadería Andina, a todos mis profesores y compañeros.
- Al Dr. Teófilo León Quispe Quispe y al Dr. Guido Pérez Durand por su dirección en el presente trabajo.
- Al Dr. Teodosio Huanca Mamani, MVZ Mario Lino Gonzales, MVZ Rómulo Sapana, MVZ Oscar Cárdenas y todo el personal del CIP Quimsachata-INIA.
- Al Mg. Alexei Santiani, Dr. Wilfredo Huanca, Mg. Shirley Evangelista y los alumnos del Laboratorio de Reproducción Animal de La Facultad de Medicina Veterinaria-San Marcos-Lima.
- Al MVZ Rubén Mamani Cato y al MgSc. Hugo Deza Calsin por el asesoramiento estadístico.
- A la Dra. Susana Giuliano y la Dra. Ignacia Carretero de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires-Argentina por la literatura y las correcciones en metodología utilizada.
- Al Dr. José Tang y al MVZ Alcides Capcha de Agroveter Market por proveer las hormonas necesarias.
- A todas aquellas personas que indirectamente me ayudaron en la ejecución de la tesis en sus diferentes fases.

A todos ellos, Muchas Gracias.

JOEL IVAN

DEDICATORIA

A dios, creador de esta maravillosa naturaleza y por ser fuente de vida

A Guido y Esther, mis padres, amigos y compañeros en todos los pasos de mi vida

A Ivonne, Diego y Joaquin, y a las familias Pacheco y Curie por todo el amor familiar que da felicidad

A los amigos de siempre, Dino, Hugo, Yodis, Ruben, Ronald, Edison, Wilson y Coco.

JOEL IVAN

INDICE

INTRODUCCION	9
CAPITULO I	
EL PROBLEMA DE INVESTIGACION	11
CAPITULO II	
MARCO TEORICO	13
ANATOMÍA TESTICULAR DE LA ALPACA	13
GLÁNDULAS ANEXAS	14
FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DEL MACHO	15
SEMEN	21
CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DEL SEMEN	23
CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DEL SEMEN	27
TESTOSTERONA	34
GnRH	38
OXITOCINA	41
CAPITULO III	
METODOLOGÍA	44
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSION	52
EVALUACION SEMINAL	53
EVALUACION HORMONAL	69
CAPITULO V	
CONCLUSIONES	78
CAPITULO VI	
RECOMENDACIONES	79
CAPITULO VII	
BIBLIOGRAFIA	80
ANEXOS	92

RESUMEN

Se puede mejorar las características seminales en alpacas usando hormonas exógenas, para lo cual se evaluó los efectos de la GnRH y Oxitocina sobre las características seminales y concentraciones séricas de testosterona en alpacas. El trabajo se realizó en el CIP Quimsachata y en el Laboratorio de Reproducción Animal de la FMV-UNMSM-Lima, utilizando 10 machos para colecciones seminales post aplicación de 50 µg de acetato de busserelina (GI), 50 UI de oxitocina (GII) y 50 µg de acetato de busserelina + 50 UI de oxitocina (GIII), y 12 machos para determinación hormonal. Se evaluaron: volumen, color, aspecto, pH, concentración, vitalidad, motilidad, endosmosis y anormalidades, se obtuvo 3 mL de sangre post aplicación hasta los 135 minutos, se obtuvo suero sanguíneo y se valoró testosterona por RIA. Los resultados fueron: volumen (1.77, 1.97, 1.07, 2.92 mL); pH (7.657, 8.017, 8.215, 7.889); concentración (110 333 333.00, 78 555 555.56, 11 625 000.00, 66 444 444.44 X10⁶/mL); vitalidad (64.44, 65.78, 37.00, 76.67 %); motilidad (45.2, 28.9, 3.0, 42.2 %); endosmosis (34.4, 17.7, 5.2, 22.0 %); anormales (27.2, 33.0, 29.0, 26.2 %); color (blanco opaco, blanco opaco, blanco cristalino); aspecto (viscoso, semiviscoso, liquido), para los Grupos I, II, III respectivamente y observando los picos de testosterona: 15.2745 ng/mL a 60 minutos (GI), 7.3258 ng/mL a 45 minutos (GII), 11.0151 ng/mL a 105 minutos (GIII) post aplicación; por lo cual concluimos que se puede mejorar en las características seminales y de testosterona sérica utilizando GnRH, seguida por la oxitocina, mientras que la combinación GnRH + oxitocina desmejora la calidad seminal, por lo cual se recomienda el uso de la GnRH para mejorar la calidad seminal.

ABSTRACT

Is posible to improve the alpaca seminal characteristics, using exogenous hormones, for which we evaluated the effects of GnRH and Oxitocine on the seminal characteristics and serum concentrations of testosterone in alpacas. The work was carried out in the CIP Quimsachata and at Animal Reproducción's Laboratory of the FMV UNMSM Lima, utilizing 10 males for seminal collections after application of 50 ug of buserelin acetate (GI), 50 UI of oxitocine (GII) and 50 ug buserelin acetate + 50 UI oxitocine (GIII), and 12 males for hormonal determination. We evaluated: Volume, color, aspect, pH, concentration, vitality, motility, endosmosis and abnormalities, We bleed 3 mL of blood serum until 135 minutes post application and assesment testosterone concentration by radioimmunoassay technique. The results were : Volume (1,77, 1,97, 1,07, 2,92 mL); pH (7,657, 8,017, 8,215, 7,889); Concentration (110 333 333,00, 78 555 555,56, 11 625 000,00, 66 444 444,44 X106/mL); Vitality (64,44, 65,78, 37,00, 76,67 %); Motility (45,2, 28,9, 3,0, 42,2 %); Endosmosis (34,4, 17,7, 5,2, 22,0 %); Abnormalities (27,2, 33,0, 29,0, 26,2 %); Color (white opaque, white opaque, white crystalline); Aspect (viscous, semi-viscous, fluid), for the Groups I, II, III respectively and observing the peaks of testosterone: 15,2745 ng/mL to 60 minutes (GI), 7,3258 ng/mL to 45 minutes (GII), 11,0151 ng/mL to 105 minutes (GIII) after application. We concluded that for utilizing GnRH can get better in the seminal and serum testosterone characteristics, followed for the oxitocina, whereas the combination GnRH + oxitocina damages the seminal quality, for which is recommended the use of GnRH to improve the semen quality.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. características macroscópicas del semen de alpacas

Tabla 2. Características microscópicas del semen de camélidos

Tabla 3. Composición bioquímica del semen de alpacas.

Tabla 4. Concentración de testosterona por edad en alpacas

Tabla 5. Niveles de testosterona circulante (pg/ml) en alpacas en diversas épocas del año.

Tabla 6. Distribución de los animales de experimentación.

Tabla 7. Características seminales cuantitativas de alpacas del grupo I.

Tabla 8. Características seminales cualitativas de alpaca del grupo I.

Tabla 9. Características seminales cuantitativas de alpacas del grupo II.

Tabla 10. Características seminales cualitativas de alpaca del grupo II.

Tabla 11. Características seminales cuantitativas animales tratados con Oxitocina + GnRH (GIII).

Tabla 12. Características seminales cualitativas animales tratados con Oxitocina + GnRH (GIII).

Tabla 13. Concentraciones promedio de testosterona sérica (ng/ml) en los tres grupo de de estudio (GI, GII y GIII).

INTRODUCCIÓN

El problema principal dentro de las características particulares reproductivas en las alpacas machos, es la escasa producción seminal, baja calidad en concentración, motilidad, vitalidad así como su alta viscosidad (Sumar, 1983; Bravo, 2002). El conocimiento sobre andrología en alpacas es muy limitado, no existen protocolos hormonales orientados a mejorar la eficiencia reproductiva en los machos reproductores y el vacío del conocimiento en este campo se presenta como un problema el cual intentará ser resuelto mediante esta investigación.

El macho es uno de los dos componentes del proceso reproductivo y es el encargado de fertilizar, dentro de un proceso reproductivo manejado por el hombre, a un gran número de hembras, por lo que mientras más eficiente reproductivamente sea el macho, este proceso reproductivo se verá favorecido y se obtendrán mejores tasas de fertilidad y eso implica utilizar menos machos por número de hembras del rebaño (Hafez, 2000).

Las características seminales de camélidos sudamericanos hacen que la colección, evaluación y posterior utilización sea dificultosa, obteniéndose una gran variedad de datos entre los diferentes investigadores (Pacheco, 2008), existiendo varios factores que causan su variabilidad, entre ellos se encuentran la época, la edad, frecuencia de colección y el método de colección (Sumar, 1983; Bravo, 1998).

Las características seminales pueden ser mejoradas mediante la utilización de hormonas exógenas, lo cual ya fue descrito en otras especies como en camellos utilizando GnRH, el cual incrementa la liberación de LH, aumentando los niveles de testosterona, este efecto produce una mejora de los estándares seminales

(Willmen, *et al.* 1992) y en humanos la utilización de la oxitocina actúa en el transporte de las células espermáticas desde sus reservorios seminales, incrementando la concentración y la vitalidad de estos (Thackare *et al.*, 2006).

Así como se pudo observar en otras especies que después de la aplicación de hormonas exógenas hubo mejoras en diferentes características seminales y teniendo en cuenta las bajas características seminales en alpacas es que se realizó el presente trabajo de investigación, además de verificar su efecto sobre la concentración sérica de testosterona, puesto que una gran variación de esta hormona podría traer problemas posteriores en el proceso de espermatogénesis y produciendo disminución de los estándares seminales.

El desarrollo de técnicas como la inseminación artificial está orientado a la utilización de animales machos superiores en características productivas y su capacidad de producir semen de alta calidad para la preparación de múltiples dosis, lo cual es muy difícil de realizar dadas las bajas características de semen que naturalmente presentan las alpacas (Morton, *et al.* 2008), lo cual podría lograrse utilizando hormonas exógenas para inducir, de manera artificial, el incremento de las características seminales.

La reproducción en las alpacas es un proceso complicado, puesto que esta especie presenta características reproductivas diferentes en comparación con otras especies domésticas, características como el tiempo prolongado de la cópula, la posición de la copula, alta viscosidad del semen, alta variabilidad entre machos, etc (Sumar, 1983); por lo cual el manejo reproductivo de esta especie exige un tratamiento especial.

Las características macroscópicas y microscópicas del semen de esta especie presenta una alta variabilidad entre individuos, presentándose por lo general una baja calidad seminal en los machos que presentan las mejores características fenotípicas y productivas de la especie (Fernández Baca, 1991), para lo cual se vienen utilizando algunos productos nutricionales multivitamínicos y minerales con el fin de mejorar esta calidad seminal (Zapana, Comunicación personal), no obteniéndose resultados satisfactorios por lo cual se planteó en esta investigación el uso de hormonas exógenas en alpacas para incrementar los estándares seminales, así como la evaluación de la testosterona sérica.

Es de conocimiento de los productores alpaqueros que un animal de muy buena calidad genética y con excelentes características productivas como finura de fibra, densidad de vellón, uniformidad y ausencia de defectos o malformaciones, son machos de bajo libido y poca fertilidad, a pesar de ser animales excelentes productivamente, las características reproductivas son deficientes y llegan a presentar subfertilidad, por lo cual es necesario desarrollar técnicas que permitan mejorar la calidad seminal de estos animales para así asegurar su reproducción y la generación de más individuos de altas características productivas, es por estos motivos que se realiza este trabajo de investigación, con la intención de proveer al productor alpaquero un protocolo hormonal para mejorar la eficiencia reproductiva de sus machos reproductores.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

- **PROBLEMA**

Uno de los factores que causan la baja fertilidad en las alpacas es la baja calidad seminal que presentan los machos, la que se intentó mejorar utilizando suplementos multivitaminicos y minerales, mejora en la dieta, uso de antioxidantes, etc, sin obtener resultados satisfactorios, por lo cual se planteó esta investigación, con el objetivo de mejorar la calidad seminal la utilización de hormonas como la GnRH y la Oxitocina, debiéndose también evaluar el efecto de estas hormonas sobre el perfil sérico de testosterona a fin de evitar producir daño permanente sobre el proceso espermato-genico.

- **OBJETIVOS**

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- a) Determinar el efecto de la GnRH sobre las características seminales en alpacas machos
- b) Determinar el efecto de la oxitocina, sobre las características seminales en alpacas machos

- c) Comprobar el efecto combinado de la oxitocina y la GnRH sobre las características seminales en alpacas machos
- d) Determinar las concentraciones séricas de testosterona post aplicación de oxitocina y GnRH.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. ANATOMÍA TESTICULAR DE LA ALPACA

Los testículos son órganos pares de forma ovoide (52.3%), siendo en algunos casos globosos (41.2%) y en otras menos definidos (6.7%), situados en un escroto no pendulante sin un cuello definido y formando una protuberancia subanal (Sumar, 1983), ubicado en el tercio antero-inferior de la región perineal (Alanocca, 1978), a una distancia de 5.3 a 8.9 cm del ano (Sato y Montoya, 1990).

Los testículos están orientados oblicuamente, con respecto a su eje longitudinal, en dirección caudo-dorsal (Sato y Montoya, 1990), o dorso-caudal y ventro-craneal (Sumar, 1983), o de arriba abajo y de atrás adelante (Alanocca, 1978); con la cabeza del epidídimo ventral y la cola del epidídimo dorsal (Bravo, 2002). La consistencia es turgente y elástica (Alanocca, 1978). Normalmente los 2 testículos tienen el mismo tamaño (largo y ancho) (Alanocca, 1978; Sumar, 1983), peso (Alanocca, 1978) y volumen, con los siguientes volúmenes: 3.66 ± 0.4 , 9.53 ± 0.64 , 12.90 ± 0.38 y 10.0 ± 0.38 ml a los 1, 2, 4 y 5 años de edad, respectivamente (Jaén *et al.*, 1999). La longitud

testicular se incrementa con la edad, así tenemos: 1.9, 2.9 y 4.2 cm. para 1,2 y 3.5 años de edad respectivamente (Carpio *et al.*, 1999)

2.2. GLÁNDULAS ANEXAS

2.2.1. PROSTATA

La próstata tiene la forma de H y limita dorsal y lateralmente del cuello de la vejiga (Sumar, 1983), presentado dos porciones: el cuerpo prostático y la porción diseminada (Sato y Montoya, 1990). La glándula tiene un diámetro transversal aproximado de 4 cm. y de 1 cm. de grosor (Sumar, 1983), se reportó por ultrasonografía que la próstata se localiza por encima de la uretra, de forma aplanada y de dimensiones (largo x ancho) 3.5 x 1.5 y 2.2 x 1.3 cm. para llamas y alpacas, respectivamente (Bravo y Sumar, 1991). La irrigación sanguínea de la próstata está dada por la arteria urogenital principalmente y también por la arteria pudenda interna en su porción superficial; las glándulas bulbouretrales están irrigadas por la arteria pudenda interna (Zambrano, 2009).

La próstata es una glándula de particular importancia en el tracto reproductivo de los rumiantes pues produce una secreción que se adiciona al plasma seminal y que es rico en sustancias como: potasio, zinc, ácido cítrico, fructosa, glicerilfosforilcolina, espermina, aminoácidos libres, prostaglandinas y algunas enzimas (Brisdbidger y Taylor, 2006).

2.2.2. GLÁNDULAS BULBOURETRALES

Las glándulas bulbouretrales, son 2 órganos dispuestos simétricamente en la porción final de la uretra pélvica, de forma ovoide, pequeñas, su forma

recuerda al garbanzo, cubiertas por una capsula muscular y se encuentran en situación dorso-lateral o lateralmente a la porción final de la uretra pélvica, en la salida pélvica, cerca del arco isquiático, y están envueltos por el músculo bulboglandular (Sumar, 1983; Valencia *et al.*, 1986; Sato y Montoya, 1990; Sumar, 1991). Cada glándula es independiente y solo están unidos por una aponeurosis y desembocan en un saco ciego que se encuentra en la raíz del pene (Peña, 1994).

2.3. FISILOGIA REPRODUCTIVA DEL MACHO

La fisiología reproductiva del macho presenta algunas características diferentes a la hembra, como por ejemplo que el macho no presenta el centro cíclico; la descarga de GnRH del hipotálamo ocurre en forma intermitente en el día y la noche, esta descarga de GnRH tarda algunos minutos y causa la liberación de LH aproximadamente 30 minutos después del impulso de la GnRH, esta hormona actúa sobre las células de Leydig, las que inician su producción de progesterona, gran parte de la cual es transformada en testosterona, la cual tiene vida corta y de secreción pulsátil, durando aproximadamente 20 a 60 minutos (Senger, 2003).

El factor de liberación gonadotropico del hipotálamo o GnRH alcanza el sistema portal hipotalámico hipofisario donde estimula la liberación de FSH y LH cuyo órgano diana es el testículo. La FSH actúa sobre las células de Sertoli y de esta forma promueve la espermatogénesis y la síntesis de ABP, en tanto que la LH actuando sobre las células de Leydig estimula la síntesis de testosterona. A partir de aquí se establece una retroalimentación negativa testiculos-hipófisis-hipotálamo ya que el incremento de testosterona reprime la síntesis y liberación

de LH a nivel hipofisario y de GnRH en el hipotálamo. En este último caso la reducción en la liberación de GnRH además determina una retroalimentación negativa sobre la FSH. Por otro lado, la FSH además se encuentra bajo otro mecanismo de retroalimentación negativa a partir de la acción de las inhibinas sintetizadas en las propias células de Sertoli. En algunos casos también se plantea que la PRL tiene una acción sinérgica con la LH para la producción de testosterona (Hafez, 2000).

2.3.1. ESPERMATOGÉNESIS EN MAMÍFEROS

El proceso de la espermatogénesis está subdividido en tres fases; la primera fase es la de la proliferación, que consiste en todas las divisiones mitóticas de la espermatogonia hasta llegar a la espermatogonia B, un número importante de espermatogonias retornan a la línea de base para renovar células; la segunda fase es la fase meiótica que involucra al espermatocito primario y secundario, reduciendo la carga genética a un número haploide y causando entrecruzamientos de ADN, asegurando la diversidad genética de las células producidas posteriormente; la última fase se denomina fase de diferenciación y consiste en la producción de células especializadas (espermatozoides) a partir de células redondas (Senger, 2003), cuatro eventos importantes suceden en esta última fase, estos son: formación del acrosoma, condensación de la cromatina, formación del flagelo y el exceso de citoplasma es eliminado en forma de gotas citoplasmáticas o cuerpos residuales (Rosenfeld, 2007).

Las espermatogonias son células diploides, sucesivas transformaciones dan lugar a espermatocitos primarios, también diploides pero de un tamaño mucho mayor. Cada espermatocito primario sufre una primera división por meiosis

(meiosis I) y genera dos espermatocitos secundarios haploides, es decir, con la mitad de la dotación cromosómica de la especie. A su vez, estos pasan por la mitosis II y producen cuatro células haploides llamadas espermátidas. A partir de este momento se inicia la maduración de los espermatozoides, mediante la diferenciación de las espermátidas. Este último paso se denomina espermiogénesis, que consta de la reducción total del volumen citoplasmático, alargamiento del núcleo que se ubica en la zona anterior (cabeza) del espermatozoide, ubicación de las mitocondrias en la parte posterior de la cabeza (cuello) y formación de un largo flagelo a partir de los centriolos de la espermátida (Hafez, 2000).

2.3.2. CELULAS DE LEYDIG

Las células de Leydig o también llamadas células intersticiales, se encuentran ubicadas entre los túbulos seminíferos y están encargadas de producir hormonas esteroideas, siendo de gran importancia dentro del proceso de espermatogénesis (Hafez, 2000).

Las células de Leydig en respuesta a la LH o también llamada ICSH en machos (*intersticial cell stimulating hormone*) producen testosterona y una pequeña cantidad de estrógenos en animales adultos (Rosenfeld, 2007).

Las células de Leydig llegan a ser refractarias bajo sostenidas concentraciones de LH, entonces una continua y alta concentración de LH resulta en una reducción de la secreción de testosterona, posiblemente a causa de la reducción del número de receptores a LH en estas células (Senger, 2003).

2.3.3. CELULAS DE SERTOLI

Las células de Sertoli son células ubicadas en los túbulos seminíferos en los testículos, brindan soporte estructural y metabólico a las células durante la espermatogénesis por lo cual también se conocen como células sustentaculares de Sertoli (Hafez, 2000).

La función de las células de Sertoli es FSH-dependiente, altos niveles sostenidos de testosterona sanguínea suprime la secreción de FSH y las funciones relacionadas se detendrán; las células de Sertoli convierten la testosterona a estradiol utilizando el mismo mecanismo mediante el cual las células de la granulosa en el folículo ovárico (Senger, 2003).

Las células de Sertoli producen la proteína ligadora de andrógenos (*androgen binding protein* ABP) así como también inhibina en respuesta a la FSH, el ABP concentra la testosterona producida por las células de Leydig, así como de otros andrógenos en el epitelio seminífero lo cual es necesario para una espermatogénesis normal (Rosenfeld, 2007).

2.3.4. ENDOCRINOLOGIA DE LA ESPERMATOGENESIS

A un nivel paracrino, la espermatogénesis está controlada por la secreción de GnRH que estimula la secreción de LH y de FSH de la glándula pituitaria, la LH es la hormona encargada de estimular la producción de testosterona por las células de Leydig en el estroma testicular (Sutovsky y Manandhar, 2006).

La regulación endocrina de la espermatogénesis es lograda vía el clásico feedback negativo; teniendo lugar en el eje Hipotálamo-Hipofisis-testículos; puesto que la producción de espermatozoides depende de la estimulación de la hipófisis por el hipotálamo al secretar GnRH, esta causará la liberación de LH y

FSH, la LH estimula la secreción de testosterona la cual a su vez estimula al hipotálamo a liberar GnRH y la FSH estimula a las células de Sertoli para producir inhibina, la cual tiene un efecto de Feedback negativo para limitar la producción de FSH (O'Donell *et al.*, 2006).

La testosterona es esencial para la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis, las células de Leydig producen altas cantidades de esta hormona, llegando a tener concentraciones testiculares de 50 a 100 veces más altas que la circulación general, se necesita mayor cantidad de testosterona para la iniciación, pero menor cantidad para el mantenimiento, por lo cual las células de Sertoli se encargan de disminuir esta cantidad al captarla para producir DHT y estrógenos, pero también produciendo ABP la cual "secuestra" casi el 80 % de la testosterona testicular: cambios en las concentraciones de testosterona podrían afectar la producción espermática, elevaciones de testosterona tienen efecto negativo en el desarrollo de las espermatogonias (O'Donell *et al.*, 2006).

2.3.4. ESPERMATOGÉNESIS EN LA ALPACA

En alpacas de 2, 3, 4 y 5 a más años de edad se aprecia en los túbulos seminíferos un epitelio germinativo distribuido ordenadamente en estratos, con diferenciación de las células germinales en espermatogonias de forma redondeada en la membrana basal, espermatoцитos primarios y secundarios en mayor cantidad de forma triangular alargadas y espermatozoides en dirección a la luz del túbulo, las células de Sertoli intercaladas en el epitelio germinal (Rojas, 1998).

Así mismo, en alpacas, y sólo en los meses 4, 6 y 12 de edad se aprecian cambios sustanciales en los túbulos seminíferos. A los 4 meses de edad: el epitelio seminífero está constituido por células de Sertoli inmaduras y células germinales. Las células de Sertoli son las más numerosas (24 por sección tubular transversal), y adoptan un patrón pseudoestratificado. Las células germinales (gonocitos), son células de gran tamaño, que se sitúan preferentemente en el centro del túbulo. A los 6 meses de edad, los gonocitos se desplazan desde el centro del túbulo seminífero hacia la membrana basal y se van reacomodando. Se observa una proliferación de las células de Sertoli. A los 12 meses de edad, los túbulos seminíferos aumentan de longitud. Las células de Sertoli están distanciadas y el espacio que queda entre ellas está ocupado por las células germinales que se van disponiendo en estratos. Se observan escasas espermatogonias en el centro tubular (Pasco, 2001).

Se puede observar espermatozoides maduros en machos desde los 18 meses de edad, en baja cantidad y calidad pero este comportamiento demuestra la influencia de la edad, lo cual está relacionado con el tamaño testicular, observándose presencia de espermatozoides cuando los testículos alcanzan los 2.7 cm de largo y con un nivel de testosterona sérica sobre 1156.0 pg/ml, a pesar de encontrarse aun la presencia de adherencias peneprepuciales, las cuales desaparecen completamente a los 40 meses, cuando existe un nivel de testosterona de 5247.0 pg/ml (Carpio *et al.*, 1999).

2.3.5. MECANISMO DE ERECCION DEL PENE

La erección del pene resulta de una serie de eventos bioquímicos y hemodinámicos, asociados con la relajación de los músculos cavernosos,

incremento del flujo sanguíneo peneano y la oclusión venosa del pene, resultando en alargamiento y rigidez del pene, la testosterona actúa regulando la erección mediante su transformación en dihidrotestosterona, pero el mecanismo molecular es aún desconocido (Bhansin y Benson, 2006)

2.3.6. MECANISMO DE EYACULACION

La eyaculación es un mecanismo por el cual se expulsa fuera del cuerpo el semen formado en el colículo seminal y comprende la contracción de los músculos bulbouretrales y células mioepiteliales de las glándulas anexas, uretra y del conducto deferente, el control de este mecanismo es mayoritariamente nervioso, específicamente por el sistema simpático (Bhansin y Benson, 2006).

2.4. SEMEN

2.4.1. COLECCIÓN DE SEMEN EN LA ALPACA

La colección de semen depende de una buena y constante producción espermática para que la calidad del semen sea buena. Las técnicas de colección de semen están bastante desarrolladas en otros animales de granja, especialmente en rumiantes domésticos en los cuales ya es un procedimiento de rutina, pero en camélidos, dadas las especiales características reproductivas, anatómicas y fisiológicas de estas especies, esta colección es bastante difícil y no existe un protocolo recomendado y una técnica óptima, así como su manejo posterior (Pacheco, 2008).

2.4.2. VAGINA ARTIFICIAL

Esta técnica fue desarrollada hace tres décadas (Sumar y Leyva, 1981), para lo cual se construyó un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la vagina artificial fue una modificación de la vagina artificial usada para vacunos y ovinos, la cual consistía en un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 cm de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que envolvía un alambre en espiral simulando la cervix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino o un tubo de centrifuga, el agua a 45° se coloca por una válvula-espita; los machos aceptaron el maniquí después de un corto entrenamiento; la copula se interrumpía cada 10 min aproximadamente para renovar el agua caliente, el semen colectado varia, dependiendo de los machos, el tiempo de copula y el número de interrupciones que se les hacía para cambiar el agua, el color del eyaculado, independientemente del volumen, fue de un blanco lechoso a blanco claro, este semen no muestra motilidad masal por lo espeso de su consistencia.

La utilización de vagina artificial en combinación con una hembra receptiva es la técnica más óptima de obtener semen de buena calidad, el que se puede utilizar para fines de inseminación artificial, teniendo en cuenta de usar una fuente de calor continuo y la característica que imite al cervix (Vaughan *et al.*, 2003).

En un estudio llevado a cabo en el CIP Quimsachata (Dávalos y Olazábal, 2002), se encontró que utilizando hembra receptiva al lado del maniquí incrementaba la calidad del eyaculado obtenido mediante vagina artificial a comparación de solo utilizar el maniquí, incrementando el tiempo de cópula de 15.9 a 16.8 minutos, el volumen de 1.03 a 1.17 mL, la motilidad de 34.2 a 68.9

%, la concentración de 32.8 a 57.5 x10⁴/mL y los espermatozoides vivos de 34.3 a 72.1 %.

La colección de semen utilizando vagina artificial modificada una vez por semana y por un periodo de 10-12 minutos de copula permitió la obtención de semen con un volumen promedio de 1.12 mL, concentración promedio de 20 770 000/mL, motilidad de 64.91 % (Pérez, 1997).

2.4.3. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL SEMEN DE ALPACA

Las características macroscópicas del semen de camélidos sudamericanos se evalúan mediante varios parámetros, entre las cuales se consideran volumen, color, aspecto y pH. Estas características del eyaculado dependerán del tipo de colección y de la manipulación, así como de las características fisiológicas de cada animal.

Volumen

El volumen varía con la metodología de colección y está influenciado por factores intrínsecos y medioambientales. El rango de volumen de eyaculado es bastante grande en alpacas, se tiene reportado desde 0.4 a 12.5 mL (Bravo, 2002; Sumar, 2000). El factor más importante en la variación del volumen del eyaculado en alpacas es la frecuencia de colección, pues el volumen disminuye a medida que se incrementa el uso del macho, las últimas eyaculaciones tienen menos volumen y esta disminución se presenta notoriamente después de la tercera eyaculación continua (Quispe, 1987; Tibary y Vaughan, 2006). Este aspecto es discutible pues se encuentra en la literatura observaciones que

indican que la frecuencia de colecciones no afectarían el volumen del eyaculado (Bravo *et al.*, 1997; Urquieta *et al.*, 2005).

Color

El semen de alpaca presenta un color que varía desde el blanco lechoso hasta el blanco cristalino, siendo muy variable de acuerdo al método de colección, a la concentración espermática y a la frecuencia de colección (Bravo, 2002; Sumar, 2000); El color predominante del semen durante la época reproductiva es el blanco opaco, presente en el 76.9 % de las observaciones, también se encontraron muestras de color blanco (5.1 %), blanco amarillento (5.1 %) y blanco translucido (12.8 %), se observó que a medida que avanzaban los días seguidos de colección, el color fue variando de blanco opaco al blanco translucido, evidenciando que la concentración espermática estaría relacionada al color del semen en alpacas (Urquieta *et al.*, 2005). Flores, *et al.* (2002) reportan el 84.2 % de las muestras de semen obtenido por vagina artificial de un color blanco opaco, seguido de blanco (10.5 %) y blanco amarillento (5.3 %).

En semen de llama colectado por el método de vagina artificial se observó que el 69 % de muestras fueron blanco cristalino, 29 % fueron blanco grisáceo y 2 % fueron blanco lechoso, encontrándose relación a la concentración espermática (Fernández *et al.*, 2003).

Viscosidad

El semen de alpaca es altamente viscoso, siendo muy difícil separar los espermatozoides del plasma seminal por centrifugación así como la estimación

de la concentración espermática por medios convencionales, además que esta viscosidad confiere al espermatozoide un movimiento lento diferente a lo observado en otras especies domesticas, por estar aprisionado por el gel del plasma seminal (Sumar, 1985).

En un estudio realizado en semen de llamas, se describe al semen como un fluido no newtoniano pseudoplástico desde el punto de vista de la física, concluyéndose que la viscosidad del eyaculado de llama no está influida por la concentración espermática ni por el volumen del eyaculado, por lo que la medición de la viscosidad del semen mediante el uso de un viscosímetro es esencial y por lo tanto los reportes de viscosidad mediante la capacidad de producir hilo (filancia) no estaría adecuado para este tipo de fluido (Casaretto *et al.*, 2008). Esta viscosidad es atribuida a la presencia de mucopolisacaridos de secreciones de las glándulas bulbouretrales o de la próstata (Garnica *et al.*, 1993); en llamas se describe que la fracción viscosa del semen tendría su origen en las secreciones de las glándulas bulbouretrales (Vino *et al.*, 2003). Eyaculados de llama obtenidos por vagina artificial presentaron 21 % de viscosidad alta, 35 % de viscosidad media y 44 % de viscosidad baja (Fernández *et al.*, 2003).

pH

El pH es la concentración de iones hidrogeno, se expresa por medio de un número que va desde el 0 al 14, un pH con valor de 7 indica que están presentes igual número de iones hidrogeno e iones hidroxilo, un pH inferior indica que existen más iones hidrogeno (acidez) y un pH superior a 7 indica que existen más iones hidroxilo (alcalinidad) (Murray *et al.*, 2001). En

camélidos, la colección de espermatozoides del conducto deferente sin la presencia de plasma seminal dio un pH de 6.5 por su alta concentración (80-120 millones en 0.02 ml), lo cual indicaría que el plasma seminal contiene sustancias amortiguadoras en su composición (Deza, 2004).

El pH del epidídimo y conducto deferente fluctúa entre 6.72 a 6.39; en la próstata y glándulas bulbouretrales se encuentra entre 6.06 y 6.18 y el pH de la uretra es de 7.24 en alpacas adultas, siendo esta última más alcalina producto de su contaminación con orina (Huamantuco, 2005).

Las características macroscópicas del semen de alpaca se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1
Características macroscópicas del semen de alpacas

AUTOR	MÉTODO DE COLECCIÓN	VOLUMEN mL	ASPECTO	COLOR	pH
Sumar y Leyva 1981.	V.A.	3.7-12.5	Viscoso-espumoso	Blanco lechoso	-
Quispe, 1987.	V.A	0.4-2.7	Viscoso	Blanco cristalino	-
Cardenas <i>et al.</i> , 1987	E.E.	1.0	-	-	7.1
	V.A.	2.3	-	-	7.09
Davalos y Olazábal, 2002	V.A.	1.03 ± 0.03	Semiviscoso	-	-
Galindo, 1995.	V.A. + H.R.	1.73 ± 0.09		-	-
	V.A	1.64-1.80	Viscoso	Blanco Cremoso	-
Rivera. 1998.	V.A	0.5-3.2	Viscoso	-	7.91
Huanca, T, y Gauly, 2001.	V.A	2.09-1.4	Viscoso	-	-
Bravo, 1997	V.A.	1.5	Viscoso	-	7.8

V.A : vagina artificial
H.R = hembra receptiva
EE: electroeyaculación

2.4.4. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE ALPACA

Las características microscópicas más importantes que se evalúan en el semen son concentración, motilidad, vitalidad, endósmosis y porcentaje de anomalías (Tabla 2).

Concentración

La determinación de la concentración espermática en semen de alpaca se ve dificultada por la viscosidad del semen, pero una modificación a la técnica del hemocitómetro es realizada diluyendo previamente el semen en solución salina en 1:100, 1: 50 ó 1: 200 y tomando 10 μ L para cargar la Cámara de Neubauer ó hemocitómetro, luego se realizan las lecturas de manera similar que el semen de otras especies, este método es usado por todos los investigadores de semen en alpacas por lo que los datos reportados en concentración espermática de alpacas fueron obtenidos con esta técnica (Bravo, 2002).

Con el objeto de reducir la viscosidad y mejorar la manipulación del semen de camélidos y determinar la concentración se puede realizar el uso de diferentes enzimas para degelificar el eyaculado (Bravo, 2003).

La frecuencia de montas o de colecciones afecta de manera negativa a la concentración espermática en alpacas (Urquieta *et al.*, 2005), Bravo, *et al* (1997) reportaron que la concentración desciende de 72.2×10^6 a 51.9×10^6 al segundo eyaculado y a 45.4×10^6 al tercero, por lo que no se recomienda una sobre exigencia durante la época reproductiva a fin de no causar una caída en el porcentaje de fertilidad.

Motilidad

Los espermatozoides de camélidos exhiben motilidad individual por la contracción del flagelo en el mismo lugar, de manera oscilatoria; la evaluación de la motilidad se realiza inmediatamente a la colección y sobre una platina temperada, realizándose el conteo de los espermatozoides con movimiento en un campo y expresándolo en porcentaje (Bravo, 2002).

El porcentaje de motilidad no se ve afectado por el número de eyaculaciones entre un macho pero sí varía entre varios machos evaluados (Bravo *et al.*, 1997). La motilidad individual es muy baja en semen no diluido, es descrita como oscilatoria y solo un 5-10 % de los espermatozoides motiles tienen movimiento de avance lineal, siendo necesario licuefactar el semen para observar mejor la motilidad, pues es muy difícil observarla en semen entero por su naturaleza viscosa (Tibary y Vaughan, 2006).

Vitalidad

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos/muertos se requiere de la utilización de coloraciones supravitales, el colorante más utilizado es el colorante de Hancock (eosina/nigrosina) que permite visualizar los espermatozoides vivos de un color blanco brillante y los muertos de un color rosado, todos sobre una superficie oscura (Bravo, 2002; Aller *et al.*, 2003).

El porcentaje de espermatozoides vivos es constante a pesar de incrementar la frecuencia de colección, existe una ligera disminución de la vitalidad entre colecciones pero no es significativa (Bravo *et al.*, 1997).

La vitalidad y la motilidad de los espermatozoides de llama obtenidos por vagina artificial se ve afectada negativamente por la presencia de espuma en el

eyaculado, el cual se forma a causa de los movimientos de penetración del macho (Giuliano *et al.*, 2007).

Últimas investigaciones en la evaluación de la vitalidad sugieren que la utilización de tinciones supravitales no son adecuadas para el semen de camélidos, puesto que muchas veces el gel del plasma seminal no permite que el colorante tenga contacto con la membrana espermática, es por esto que se propone la utilización de tinciones fluorescentes como el fluorocromo diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e yoduro de propidio (PI) para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática y así la vitalidad, reportándose datos de vitalidad en espermatozoides de llama obtenidos por electroeyaculación de 59.70 % (Director *et al.*, 2007) y 63.7 % (Carretero *et al.*, 2009).

Endósmosis

La integridad de la membrana espermática es de fundamental importancia en el proceso de fertilización y una evaluación de su funcionalidad es un indicador de la capacidad fertilizante del espermatozoide, la cual puede evaluarse observando la capacidad de la cola espermática de enrollarse en presencia de una solución hipoósmotica y es un signo del transporte de agua a través de la membrana cuando esta se encuentra funcional y activa (Jeyendran *et al.*, 1984).

Durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo y el conducto deferente, el espermatozoide experimenta un cambio en el medioambiente pues este varía en osmolaridad y entonces la membrana espermática adquiere la capacidad de regular el volumen celular (Petrunkina *et al.*, 2007).

El protocolo del test hipoósmotico debe adaptarse a la especie para tener mayor confiabilidad en los resultados de acuerdo a las características del semen y la forma de manejo, ya sea semen fresco o semen congelado, así como en caprinos se reportó 50 % de endósmosis en una solución de 125 mosmol (Fonseca *et al.*, 2005), en perros de 79.89 % en una solución de 100 mosmol (Dobranic *et al.*, 2005), en humanos de 60.1 % en una solución de 150 mosmol (Jeyendran *et al.*, 1984),

En llamas, existen varias experiencias en las cuales se realizó el test hipoosmótico en semen fresco y entero, determinándose 40 % de endósmosis en una solución de 100 mosmol, se sugiere que el bajo porcentaje de endósmosis se deba a la alta viscosidad que impide que la membrana espermática tenga contacto con la solución hipoosmotica (Giuliano *et al.*, 2007a). Otros reportes en llamas indican 59.70 % en semen colectado por electroeyaculación (Director *et al.*, 2007); 33.48 % en semen colectado también por electroeyaculación y 30.15 % en semen colectado por vagina artificial (Giuliano *et al.*, 2007b); y un último reporte indica 36 % en espermatozoides de semen colectado por electroeyaculación (Carretero *et al.*, 2009).

Anormalidades

La proporción de espermatozoides normales se encuentra entre el 60 y 90 %, observándose alto porcentaje de espermatozoides anormales en relación a otras especies, siendo, entre todas, la más importante las anomalías en la cabeza, seguidas por las gotas citoplasmáticas y luego problemas de cola (Bravo, 2002). El porcentaje de espermatozoides anormales es de 23.6 %, este porcentaje se ve aumentado de acuerdo al incremento de la frecuencia de

colección, siendo las anomalías en la cola la que más se incrementa (Bravo *et al.*, 1997). En llamas, se describe una alta variabilidad que va desde 20.9 hasta 96.1 % de espermatozoides anormales en eyaculados de varios machos evaluados y colectados por vagina artificial (Lichtenwalner *et al.*, 1996). Otros reportes hecho en semen de alpaca colectados por vagina artificial durante la época reproductiva indica que las anomalías se encuentran en un 49 % y la anomalía más frecuente son los problemas de pieza intermedia, seguido por problemas en la cabeza y luego en la cola, se indica que las cabezas solas no se consideran como anomalías pues se deben a un manejo brusco del semen y no se cuentan como anomalías (Flores *et al.*, 2002), mientras se indica que el día de copula no tendría efecto sobre los espermatozoides anormales, encontrándose un promedio de 47.7 % de espermatozoides anormales en semen de alpaca (Urquieta *et al.*, 2005.)

Estudios realizados para determinar la morfometría del espermatozoide de alpaca indican que existe una gran variabilidad respecto a la forma de la cabeza, encontrándose diferencias entre machos y entre los mismos individuos e incluso dentro un mismo eyaculado, se reporta que la cabeza del espermatozoide calificada como normal mide 6.10 μ de largo y 3.62 μ de ancho, además se encontraron cabezas piriformes, cortas, redondas y largas (Buendía *et al.*, 2002).

Estudios sobre la morfometría de espermatozoides de llama y guanaco indican una gran variabilidad entre e intra individuos, similar a los reportes en alpacas, sugiriendo que exista un polimorfismo natural en las cabezas espermáticas de camélidos sudamericanos, siendo esta una evidencia aun no concluyente

indica que una mejora y un ajuste en la forma tradicional de evaluación de camélidos es urgente (Casaretto *et al.*, 2008; Casaretto *et al.*, 2009).

Tabla 2
Características microscópicas del semen de camélidos

AUTOR	MÉTODO DE COLECCIÓN	CONCEN TRACION (Esp/mL)	MOTI LIDAD (%)	VITA LIDAD	ANORMA LIDADES
Sumar y Leyva 1981	V.A.	60 000 000	-	-	-
Cárdenas <i>et al.</i> , 1987	E.E.	38 470 500	48.2	-	-
	V.A.	33 904 000	30.6		
Davalos y Olazábal, 2002	V.A.	32 800 000	34.2	34.3	14.9
	V.A. + H.R.	57 500 000	68.9	72.1	13.9
Quispe, 1987	V.A.	500 000	51.57	62.4	-
		47 250 000			
Galindo, 1995	V.A.	920 000	-	51.57	18.5
		10 700 000			
Rivera, 1998	V.A.	16 330 000	53.92	44.15	-
Huanca y Gauly 2001	V.A.	8 000 000	-	-	-
Bravo, 1997	V.A.	56 200 000	75.2	65.3	27.7

V.A : vagina artificial
H.R = hembra receptiva
EE: electroeyaculación

2.4.5. PLASMA SEMINAL

El semen de los camélidos sudamericanos presentan alta viscosidad en comparación a otros animales de granja, lo cual dificulta mucho la obtención y el manejo del semen, pareciera que el plasma seminal actuaría alargando la vida de los espermatozoides, pues se observó que a las 18 horas de la copula recién se encontraban cantidades significativas en el itsmo, lo que indica que la capacidad fecundante y la motilidad fueron retrasadas gracias a la viscosidad del plasma seminal (Bravo *et al.*, 1996).

La composición bioquímica del semen en alpacas demostró tener características únicas, diferente a otras especies, se describe en la Tabla 3,

también se indica la alta afinidad de los espermatozoides de alpaca por la glucosa como sustrato energético, teniendo menor afinidad por la fructosa (Bravo, 2002).

Tabla 3
Composición bioquímica del semen de alpacas.

Componente	3 años de edad	6 años de edad	Rango
Cloruro (mEq/L)	348 ± 32	404 ± 34	236 – 491
Calcio (mg/dL)	18 ± 1	18 ± 3	13 – 31
Fosforo inorgánico (mg/dL)	12 ± 2	8 ± 0.4	7-17
Glucosa (mg/dL)	7 ± 0.4	5 ± 0.3	4 – 8
Fructosa (mg/dL)	-	6 ± 0.1	3 – 7
Lípidos (mg/dL)	86 ± 10	95 ± 10	51 – 115
Fosfolípidos (mg/dL)	29 ± 1	29 ± 1	27 – 31
Nitrógeno total (mg/dL)	548 ± 50	647 ± 32	398 – 697
Proteínas totales (g/dL)	3 ± 0.3	4 ± 0.2	3 – 4
Albumina (g/dL)	2 ± 0.3	2 ± 0.2	1 – 3
Globulinas (g/dL)	1 ± 0.1	2 ± 0.2	1 – 3

Fuente: Bravo, 2002.

2.4.5. RESERVORIOS ESPERMÁTICOS

Los machos presentan reservorios espermáticos dentro de los órganos reproductivos, los cuales se encargan de producir y transportar estos espermatozoides hacia la eyaculación, estos lugares son: los testículos, el epidídimo en sus tres porciones y el conducto deferente, en los que existen las siguientes cantidades antes del empadre: testículo: 92×10^6 , cabeza del epidídimo: 41×10^6 , cuerpo del epidídimo: 29×10^6 , cola del epidídimo: 107×10^6 y conducto deferente: 61×10^6 , lo que indica claramente que la mayor reserva de espermatozoides en la alpaca es la cola del epidídimo; las reservas espermáticas de la alpaca macho adulto, bajan después del periodo de empadre y es elevada durante el periodo de quietud sexual. No existen cambios significativos en los pesos del testículo, epidídimo, conducto

deferente, antes y después del empadre así como en época de quietud sexual (Bravo *et al.*, 2003).

Las bajas características seminales en alpacas se deben a que los testículos son muy pequeños en relación al tamaño y peso corporal, representando en la alpaca solo el 0.03 % del peso corporal con un peso promedio de 18 gr., es debido a esta característica que es importante considerar la existencia de reservorios espermáticos dentro del tracto reproductivo del macho (Bravo, 1995).

2.5 TESTOSTERONA

2.5.1. Testosterona

La testosterona es una hormona producida por las células intersticiales ó células de Leydig de los testículos y una pequeña cantidad es producida por la corteza suprarrenal; la testosterona es transportada en la sangre unida a una proteína globular denominada globulina de unión para esteroides, el 98 % de la testosterona circula ligada a esta proteína y el restante circula libre para entrar en la célula blanco donde se convierte en dihidrotestosterona, la cual actúa en el núcleo celular; las funciones de la testosterona son las de estimular los estadios tardíos de la espermatogenesis, prolongar la vida del espermatozoide en el epidídimo, promueve el crecimiento, y desarrollo de los órganos sexuales y mantiene las características sexuales secundarias y el libido en machos (Hafez, 2002).

Los niveles intratesticulares de testosterona son de 100 a 500 veces más altos que en la circulación general, entonces se diluye rápidamente cuando llega a la circulación sistémica, esta dilución y la relativa vida corta de la testosterona

mantiene los niveles sistémicos por debajo de manera que no causa una regulación negativa en el sistema GnRH/LH, pues si existiera altos niveles sostenidos de LH, el sistema de aclaramiento sanguíneo de testosterona fallaría causando altos niveles de testosterona, causando una retroalimentación negativa en el hipotálamo y disminuyendo los niveles de GnRH, lo cual causaría disminución de la LH, eventualmente se detendría la secreción de testosterona, interrumpiendo el proceso de la espermatogenesis (Senger, 2003).

La testosterona testicular, actúa a nivel intragonadal, en los túbulos seminíferos y extragonadalmente, regulando la secreción de las hormonas hipofisarias que influyen sobre el tracto reproductivo y conducta sexual (Desjardins, 1981).

2.5.2. Testosterona en alpacas

En alpacas crías recién nacidas, no se ha encontrado diferencia ni correlación alguna entre los niveles séricos de testosterona y el sexo, encontrándose: 561.9 y 589.9 pg/mL de testosterona para machos y hembras respectivamente (Losno *et al.*, 1983).

Se determinaron las concentraciones de testosterona sérica en alpacas machos para los 9, 10 11 y 12 meses de edad fueron: 202.3, 254.67, 708 y 1510.2 pg/mL, respectivamente. No hallándose diferencia entre los 9 y 10 meses ni entre 11 y 12 meses, pero, sí entre 10 y 11 meses; lo que indicaría que a partir de los 11 meses la producción de testosterona se encuadra en el rango de valores de animales adultos (Losno y Coyotupa, 1983).

Usando radioinmunoanálisis (RIA), se encontró valores de testosterona con alta diferencia significativa ($P < 0.05$) para alpacas machos de 1 (0.8227 ng/mL) y 2 años (1.4157 ng/mL) de edad respectivamente (Chuna, 1999).

Mediante el método de ELISA determinaron que los niveles de testosterona en alpacas machos aumentan rápidamente a partir de los 12 meses (213.5 pg/mL: indicando una mayor multiplicación y actividad de las células de leydig) y pasan de los 1000 pg/mL a los 18 meses de edad, encontrándose los siguientes valores (Carpio *et al.*, 1999):

Tabla 4
Concentración de testosterona por edad en alpacas

Edad (meses)	Testosterona (pg/mL)
9	44.1
12	213.0
18	1156.0
24	2163.0
36	5385.0
40	5247.0

Fuente: Carpio *et al.*, 1999.

Utilizando el método de RIA en muestras frescas se indica concentraciones de testosterona de 1.00 a 2.56 y de 3.44 a 8.80 ng/mL para macho pre púber y adulto, respectivamente; observándose pulsos de secreción más pronunciados en este último. Sin embargo en muestras de suero sanguíneo de animales entre 3-17 meses de edad que estuvieron almacenadas a -20°C (pero con frecuentes descongelaciones) entre 57-38 meses, que fueron sometidos a RIA de testosterona, revelaron concentraciones de testosterona por lo general inferiores a 1 ng/mL, no observándose señal de pulsos claros de secreción ni incrementos cuantitativos con el desarrollo de los animales (Pinares, 1990).

La evaluación de los niveles sericos de testosterona en alpacas adultas durante cuatro épocas del año indican la existencia de diferencias estadísticas entre épocas reproductivas y no reproductivas (Tabla 5), esta además relacionado al incremento del libido durante la estación reproductiva (Sumar *et al.*, 1990).

Tabla 5
Niveles de testosterona circulante (pg/mL) en alpacas en diversas épocas del año.

Épocas del año	Media ± ES
Marzo	1142.50 ± 108.27
Junio	992.50 ± 14.90
Septiembre	877.50 ± 74.84
Diciembre	2445.00 ± 694.82

Fuente: Sumar *et al.*, 1990.

En una práctica de manejo altoandino que permite la separación de alpacas machos y hembras, los machos presentan en promedio 3 900 pg/mL de suero sanguíneo, mientras que en época reproductiva cuando se juntan hembras y machos, alcanzan 9 000 pg/mL, similar comportamiento en vicuñas, donde en época no reproductiva presentan 288 pg/mL y en época reproductiva sube a 1 009 pg/mL, estas variaciones de testosterona no son observadas en condiciones de crianza en el hemisferio norte en donde los machos y hembras están juntos por todo el año, presentando un rango entre 900 a 1 200 pg/mL durante todo el año (Fowler, 2010).

2.5.3. Radioinmunoanálisis

Los inmunoanálisis, en general, consisten en una reacción inmunologica en la que un antisuero específico (Ac) se une a un antígeno (la hormona, Ag) y un

antígeno marcado (Ag*); el Ag, que está en un volumen específico de las soluciones estándar en un grupo de tubos en duplicado o en tubos donde se encuentra la muestra desconocida, es químicamente idéntica ó similar al Ag*, que se encuentra en una cantidad fija. Después de incubar las soluciones, se separa la hormona unida al anticuerpo (tanto la marcada como la no marcada) de la fracción libre y se cuantifica la evidencia del marcaje por radioactividad en la fracción unida al anticuerpo; en las soluciones estándar y las muestras desconocidas, la hormona no marcada compite con la marcada por un número limitado de sitios de unión del anticuerpo, debido a que las cantidades del Ac y el Ag* son mantenidas constante en un inmunoanálisis, la inhibición de la unión de Ag* al Ac está relacionada a la concentración del Ag en las soluciones estándar y las muestras, por lo tanto, la cantidad de hormona marcada unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de hormona presente en las soluciones estándar y muestras desconocidas; entonces se genera una curva de inhibición de las soluciones estándar y así se determina la concentración de la hormona en la muestra desconocida (Matamoros *et al.*, 2002).

2.6. GnRH

2.6.1. GnRH Natural

La GnRH es un decapeptido que fue primeramente caracterizado en mamíferos; la eminencia media del cerebro en mamíferos contiene gran cantidad de GnRH, indicando que esta área se comporta como un reservorio en terminales neuronales que liberaran la hormona directamente en el sistema

porta-hipofisiario, siendo esta hormona altamente específica y los receptores se encuentran en la hipófisis (Clarke y Pompolo, 2005).

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) actúa dentro de la fisiología del macho causando la elevación de la producción de la hormona luteinizante (LH) y ésta tiene un efecto directo sobre la espermatogénesis (Amman y Schambacher, 1983).

La liberación de LH inducida por la acción de la GnRH es rápida, posteriormente se libera FSH, este comportamiento se debe a que existe una cantidad de LH almacenada en las terminales neuronales y es liberada rápidamente, mientras que este impulso determina la síntesis de FSH y esta se libera después del pulso de LH, además que la vida media de la LH es de \pm 20.0 min, cuando esta hormona se clarifica del plasma, se libera recién la FSH y esta tiene una vida media de 150 min (Pawson y McNeilly, 2005).

2.6.2. GnRH sintética

Análogos de GnRH se han desarrollado desde hace varias décadas y existe gran variedad, cerca de 200 análogos se han desarrollado con el fin de ser utilizados en la reproducción de los animales, muchos de los cuales tienen una actividad biológica superior a la hormona natural y altísima afinidad a los receptores específicos a GnRH, por lo que se observó efectos negativos sobre la fertilidad y estos efectos fueron someramente investigados, viéndose que los efectos son reversibles en ratas y ovejas, por esto es importante tomar en cuenta la estructura terciaria del análogo, pues el orden de los aminoácidos influye en su potencia y el tiempo de excreción, dentro de todos los análogos, el más utilizado es la buserelina ([D-Ser(But)⁶,Pro⁹-NET] GnRH), la cual induce

a la liberación de LH en machos, produciendo un incremento de la testosterona plasmática hasta que ocurra un feedback negativo, presentando una vida media de 7 minutos (Padula, 2005).

Luego de la aplicación de Buserelina la adenohipófisis produce las hormonas LH y FSH, las cuales van a actuar regulando la esteroidogénesis gonadal y la gametogénesis en ambos sexos. Desde que fue descubierta hace más de 30 años, diversos análogos sintéticos con un potencial biológico mejorado han sido desarrollados y éstos vienen siendo utilizados en el tratamiento de diferentes endocrinopatías (Madhukar y Rajender, 2009).

Dosis repetidas de 200 ng de GnRH en toros de la raza holstein causaron un incremento en la producción seminal y las concentraciones de LH y Testosterona (Miller y Amman, 1986), mientras que dosis repetidas de 50 µg de GnRH en carneros produjeron un incremento en la concentración de testosterona sérica y un incremento de la actividad sexual (Schambacher y Lunstra, 1977). La administración de LH en equinos produce la liberación de testosterona y estrógenos desde las células de Leydig, los estrógenos mejoran esta liberación, mientras que la testosterona y la dihidrotestosterona no tienen efecto (Roser, 2001).

La administración de acetato de buserelina en dosis bajas y altas en ovinos de la raza Romney marsh causan un incremento de la concentración sérica de testosterona máxima a las 2.5 horas post aplicación; dosis bajas (0.002 mg) causaron un máximo de 14.1 ng/mL de testosterona sérica y dosis altas (0.12 mg) causaron un máximo de 23.4 ng/mL de testosterona sérica, este comportamiento es similar a lo observado en toros (Andaur *et al.*, 2003).

Carneros normozoospermicos y oligospermicos fueron tratados con GnRH para incrementar las concentraciones de testosterona, los valores iniciales previo a las inyecciones fueron 7.07 y 2.35 ng/mL para normo y oligozoospermicos respectivamente, presentando el pico de concentración a los 60 Minutos post aplicación de GnRH, llegando a valores de 10.22 y 8.16 para normo y oligozoospermicos respectivamente, así mismo se observó la mayor libido en animales normozoospermicos post tratamiento con GnRH exógena (Aksoy *et al.*, 1993).

Aplicación de 10 µg de GnRH exógena en camellos bactrianos causó la elevación de testosterona sérica, de 8.5 ng/mL hasta un pico de 16.0 ng/mL, elevando también la libido exhibida por los machos tratados, así mismo incrementa la motilidad, la concentración y el porcentaje de anormales (Willmen *et al.*, 1992).

La administración endovenosa en bolo de 100 ug de GnRH en alpacas adultas generó una máxima respuesta de secreción de testosterona a los 130 minutos de su aplicación, llegando a elevarse 210 % de la concentración basal en época reproductiva y la respuesta se dio a los 90 minutos post aplicación en la época de quietud sexual, llegando a elevarse 311 % de los valores basales, esto demuestra que la principal fuente de producción de testosterona en alpacas es el testículo y que la actividad esteroidogénica de las células de Leydig es especie-específica y circanual (Franco, 1997).

2.7. OXITOCINA

La oxitocina es una hormona peptídica que en el macho es producida en las células testiculares de Leydig y es regulada por la LH y también por la misma

testosterona (Frayne y Nicholson, 1994) y las funciones demostradas son las de regular la contractibilidad del túbulo seminífero para facilitar el transporte de espermatozoides y actúa como un modulador de la esteroidogénesis. Otras funciones de la oxitocina en el macho son las de producir la proliferación de las células epiteliales de la próstata y por ende el incremento de su tamaño y de la producción de fluido prostático, por lo que el eyaculado se incrementa en volumen (Nicholson, 1996). La oxitocina mejora la contractibilidad de los túbulos seminíferos, mediante su interacción con las células mioides peritubulares de Leydig hacia el lumen del túbulo y hacia la rete testis, desde donde su acción se incrementa y produce la contractibilidad del músculo liso del epidídimo y conducto deferente (Roser, 2001).

La oxitocina producida en el testículo, en las células de Leydig, modula la producción de testosterona, causando un incremento de sus niveles intratesticulares y séricos, además de incrementar la actividad de la enzima 5α -reductasa, la que se encarga de transformar la testosterona en dihidrotestosterona (Nicholson, 1996). Las investigaciones recientes sobre las acciones de la oxitocina en machos son aun incipientes, pero se indica que la oxitocina podría causar actividad sobre la adenohipofisis, a la cual llegaría a través del sistema porta hipofisiario, causando producción de corticotropinas, prolactina y gonadotropinas (Ivell y Russell, 1996).

La actividad de la oxitocina en los machos es similar que en las hembras causando la contractibilidad de los diferentes segmentos del tracto reproductivo del macho, iniciando el transporte de los espermatozoides luego de la espermiación en los túbulos seminíferos, continuando la contracción en los conductos eferentes, pero existe evidencia de que la contracción a nivel del

epidídimo y los conductos deferentes son estrógeno-dependientes (Voglmayr, 1975; Thackare *et al.*, 2006). Se encontró coloración inmunoreactiva positiva para presencia de oxitocina en la cabeza, cuerpo, cola del epidídimo y conductos deferentes y en plasma seminal, evidenciando que en el caballo, la oxitocina seminal presente en la fracción gelatinosa induce la motilidad espermática dentro del tracto reproductivo de la yegua (Watson *et al.*, 1998).

Estudios realizados en ratas indican que los tratamientos largos, de aproximadamente 4 semanas de administración exógena de oxitocina causa una disminución de testosterona sérica, se observó que la oxitocina exógena no afectó los niveles de LH por lo que sus efectos sobre la testosterona se producen por otro sistema aun no determinado (Nicholson *et al.*, 1991).

Dosis de 50 UI de oxitocina administrados vía intramuscular en toros holstein provoca un incremento de la concentración de espermatozoides (Berndtson e Igboeli, 1988).

La oxitocina tiene la función de producir el transporte espermático en el epidídimo, causando contractibilidad de las células mioepiteliales, aplicaciones de 10 µg de oxitocina exógena causa un incremento en la concentración espermática, el volumen y la motilidad 10 minutos después de su aplicación en carneros (Nicholson *et al.*, 1999).

Aplicación de 5 UI de oxitocina exógena vía endovenosa en carneros no causa incremento de testosterona sérica, pero sí un ligero incremento de testosterona en el plasma seminal, causando también ligeros incrementos en el volumen seminal y la motilidad espermática (Bozkurt *et al.*, 2007).

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El estudio fue realizado en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata-Illpa-INIA-Puno, ubicado en la Provincia de Lampa, Departamento de Puno, entre los distritos de Santa Lucía y Cabanillas de las provincias de Lampa y San Román del departamento de Puno, con una extensión de 6,281 ha. a una altitud promedio de 4,300 m, dentro de las coordenadas 15°04' de latitud sur, 70°18' de longitud oeste, en el piso altitudinal sub alpino de tundra pluvial; donde la temperatura fluctúa entre 2° C (mayo a julio) y 15° C (septiembre a diciembre), localizado dentro de la zona agroecológica denominada puna seca (SENAMHI 2009), con una vegetación natural predominante conformada por especies de los géneros *Stipa*, *Festuca*, *Calamagrostis* (gramíneas), *Parastrephia* y *Braccharis* (compuestas), *Carex*, *Scirpus*, *Luzula* (ciperáceas), además de los pastos naturales, los animales fueron pastoreados en parcelas de bofedal mejorado con la asociación Rye Grass-Trebol blanco y suplementación interdiaria con heno de avena en paca.

Las determinaciones hormonales fueron realizadas en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria-Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Lima-Perú

MATERIAL BIOLÓGICO

3.2. ANIMALES

Se utilizaron diez alpacas machos enteros de la raza huacaya para la obtención de semen (Tabla 6) y 12 machos enteros de la raza huacaya para la obtención de las muestras sanguíneas para la determinación de testosterona sérica; los machos para colección de semen tienen historial de producir fertilidad en hembras (fertilidad probada), puesto que de dichos animales ya se obtuvieron crías mediante inseminación artificial con semen fresco, los machos tienen edades comprendidas entre los 5 y 9 años con peso vivo promedio de 69.7 kg y con tamaños testiculares ubicados dentro del rango descrito para la especie (anexo 22), los cuales fueron previamente entrenados para la colección de semen mediante la técnica de la vagina artificial; dichos machos fueron divididos en cuatro grupos de tres animales cada uno, el grupo 1 (G-I), fue tratado con GnRH; el grupo 2 (G-II), fue tratado con oxitocina, el Grupo 3 (G-III) fue tratado con la combinación de oxitocina y GnRH y el grupo 4 (G-IV) fue el grupo control, al que se le aplicó solución salina intramuscular; de los doce animales utilizados se evaluaron 36 eyaculados.

Tabla 6**Distribución de los animales de experimentación.**

Grupos	Dosis	Colecciones/ evaluaciones	Determ. Hormonal	Animales
GnRH (GI)	50 µg /día C/7 días	9	30	3
Oxitocina (GII)	50 UI/día C/7 días	9	30	3
Oxitocina + GnRH (GIII)	50 UI/día de oxitocina + 50 µg de GnRH C/7 días	4	30	3
Grupo control	5 ml de solución salina/día C/7 días	9	30	3
Total		31	120	12

3.3. DOSIS HORMONALES

Las hormonas fueron administradas mediante los siguientes protocolos propuestos:

- Grupo I.- Se administró 50 µg IM de acetato de buserelina (GnRH) en dosis única, la evaluación de semen se realizó 1 hora después de aplicada la hormona, la aplicación de hormona se hizo una vez por semana, por tres semanas seguidas y se obtuvo un total de 3 muestras por macho lo que hace un total de 9 colecciones.
- Grupo II.- Se administró una dosis de 50 UI IM de oxitocina en dosis única, el día, luego se evaluó el semen después de 30 min de la aplicación de la hormona, la aplicación de hormona se hizo una vez por semana, por tres semanas seguidas y se obtuvo un total de 3 muestras por macho lo que hace un total de 9 colecciones.
- Grupo III.- Se realizó la aplicación de GnRH IM una hora antes de la colección de semen y 30 minutos después de esta aplicación, se administro una dosis de oxitocina IM; la aplicación de hormona se hizo

una vez por semana, por tres semanas seguidas y se obtuvo un total de 3 muestras por macho lo que hace un total de 9 colecciones.

- Grupo control.- Se aplicó 5 ml de solución salina vía intramuscular 30 minutos antes de la colección, esta administración se hizo una vez por semana, por tres semanas seguidas y se obtuvo un total de 3 muestras por macho lo que hace un total de 9 colecciones.

3.4. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

Las evaluaciones fueron hechas de las muestras de semen colectadas por vagina artificial, siguiendo los siguientes pasos:

1. Armado de la vagina artificial:

- Se armó el cuerpo de la vagina con la funda larga y se fijó la funda cónica y el tubo falcon.
- Se llenó la camiseta de la vagina artificial con agua temperada a 39°C.
- Se colocó la vagina cubierta con la frazadilla eléctrica en un maniquí, de acuerdo al protocolo utilizado en el INIA-Quimsachata.

2.- Obtención de semen: Se obtuvo el semen en un tubo Falcón y se llevó al laboratorio para la evaluación macroscópica.

3. Evaluación macroscópica:

- El volumen se determinó a la observación del tubo falcon graduado.
- El color por observación sobre una superficie oscura.
- El aspecto al inclinar el tubo falcon suavemente y observando cuán rápido discurre el semen por las paredes del tubo, describiéndose el aspecto en: liquido, semi viscoso, viscoso y muy viscoso.
- El pH realizando la medición con la ayuda de un pH-metro digital portátil

HANNA® con sensibilidad de 0.01

4. evaluación microscópica:

- La vitalidad mediante el porcentaje (%) de vivos y muertos, coloreados con eosina-nigrosina (anexo 23) por 1 minuto y observados en un microscopio óptico a 400 aumentos (40X).
- Motilidad mediante el conteo de espermatozoides motiles, se colocó la muestra de semen sobre una lamina portaobjetos temperada en una platina eléctrica y fueron observados en microscopio óptico a 200 aumentos (20X).
- Concentración mediante el conteo de los espermatozoides utilizando una cámara de Neubauer, la muestra de 0.1 ml de semen se mezcló con 0.9 ml de agua de transferencia de embriones-PBS (anexo 23) en una jeringuilla de tuberculina, de esta dilución (1:10) se mezcló 0.1 ml con 0.9 ml de agua de transferencia de embriones (1:100), posteriormente fueron evaluados en la cámara de Neubauer, se obtuvo el promedio de ambas retículas.
- Anormalidades mediante el conteo del porcentaje de espermatozoides anormales previamente coloreados con Eosina-Nigrosina.
- Endosmosis mediante test hipoosmótico utilizando solución hipoosmótica preparada con una mezcla de Fructosa y Citrato de Sodio dihidratado con una osmolaridad de 150 mosmol (anexo 22), mezclando 0.1 ml de semen con 1 ml de solución hipoosmótica en un vial e incubado en baño maria por 30 minutos, al termino del tiempo requerido se aplicó 0.1 ml de formaldehido al 10 % para detener la reacción, posteriormente se colocó sobre una lamina portaobjetos, se observó y contó a 1000 aumentos con objetivo de inmersión.

3.5. EVALUACIÓN HORMONAL

1. Se obtuvieron muestras de sangre (2 ml) por venipunción yugular utilizando un vacutainer, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 15 min, el suero obtenido fue almacenado en crioviales y mantenido en congelación a -20°C hasta su valoración. Las muestras fueron obtenidas el día de la aplicación de hormonas, a los siguientes tiempos post aplicación: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 y 135 minutos, obteniéndose un total de 10 muestras por macho, lo que hace 120 muestras en total

2. La determinación de la concentración de testosterona fue hecha en el Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Mayor de San Marcos-Lima, mediante la técnica de Radioinmunoanálisis, de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante (MP Biomedicals®, USA), que es como sigue:

- Se extrajeron los reactivos y las muestras de suero de la congeladora y se esperó su adecuación a la temperatura ambiental del laboratorio.
- Se colocó el número requerido de tubos en las gradillas de trabajo, los tubos fueron previamente identificados.
- Se adicionó 500 ul de buffer diluyente a los tubos n° 1 y 2.
- Se adicionó 50 ul de estándar con 0.0 ng/ml (suero libre de testosterona) a los tubos n° 1, 2, 3 y 4.
- Se colocó 50 ul de cada estándar de testosterona a los tubos 5 al 18 (dos repeticiones de suero estándar con 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 ng/ml)
- Se adicionó 50 ul de las muestras de suero a sus tubos correspondientes, previamente identificados.
- Se colocó 100 ul de Solución SGBI a todos los tubos de ensayo y se mezcló

todos los tubos al mismo tiempo sobre la gradilla en un vortex durante 10 segundos.

-Se adicionó 500 ul de Testosterona reactiva I¹²⁵ a todos los tubos, se tuvo cuidado de adicionar este marcador antes del antisuero.

- con excepción de los tubos 1 y 2, se adicionó 500 ul de Anti Testosterona a todos los tubos.

- Se mezcló utilizando un vortex cada uno de los tubos por 5 segundos, luego se incubó los tubos a 37°C por 120 minutos.

- Después de los 120 minutos de incubación, se adicionó 100 ul del Segundo Anticuerpo a todos los tubos, se vorteoó, mezcló y luego se volvió a incubar a 37°C por 60 minutos.

- Después de incubar por 60 minutos, se centrifugó todos los tubos de ensayo a 2300-2500 rpm (1000 x g) por 15 minutos.

- Se decantó el sobrenadante (se aspiró con papel secante la boca de los tubos antes de colocarlos en posición vertical).

- Se realizó la lectura de radiación en un contador Gamma.

- Se calculó los resultados utilizando un sistema de reducción de datos para RIA.

Se realizaron las curvas de calibración (Anexo 16) utilizando para ello los estándares, muestras de suero de alpaca congelado, muestras problema del presente trabajo, muestras de suero fresco de humano y muestras de suero fresco de alpacas machos enteros y castrados para verificar los resultados y la funcionalidad del kit.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación de cada una de las características macro y microscópicas cualitativas (volumen, pH, concentración, vitalidad, motilidad, anormalidades y endósmosis) y para la comparación de las concentraciones de testosterona se utilizó un diseño de bloque completo al azar donde el modelo aditivo lineal fue el siguiente:

$$Y_i = \mu + T_i + E_i$$

Donde:

Y_i = variable de respuesta

μ = efecto de la media poblacional

T_i = efecto del i-ésimo bloque tratamiento

E_{ij} = error experimental.

Se realizó la transformación de los valores encontrados de acuerdo al tipo de dato para disminuir la alta variabilidad, como sigue:

Los datos de concentración fueron transformados a valores logarítmicos (\log_{10}).

Los datos porcentuales de motilidad, vitalidad, endosmosis y anormalidades se transformaron a valores angulares ($\sin^{-1}\sqrt{x}$).

Los valores de pH y de volumen no se transformaron.

Se obtuvo las transformaciones de estandarización, los análisis de varianza, la prueba de Duncan (volumen, pH, concentración espermática y concentración de testosterona), prueba de Scheefe (motilidad, vitalidad, endosmosis y anormalidades) y la prueba de chi cuadrado (color, aspecto) utilizando el paquete estadístico SAS versión 9.2. (2009).

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Características seminales de animales tratados con GnRH (GI).

Tabla 7
Características seminales cuantitativas de alpacas tratadas con GnRH (GI).

GRUPO	VOLUMEN (mL)	pH	CONCENTRACION (millones/mL)	VITALIDAD %	MOTILIDAD %	ENDOSMOSIS %	ANORMALIDADES %
G I (GnRH)	1.767 ^a	7.66 ^a	110 333 333.00 ^a	64.444 ^a	45.222 ^a	34.444 ^a	27.222 ^a
Grupo control	2.922 ^a	7.89 ^a	66 444 444.44 ^a	76.667 ^a	42.222 ^a	22.000 ^{ab}	26.222 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadística entre características seminales evaluadas (P<0.05)

Tabla 8
Características seminales cualitativas de alpaca del grupo I.

COLOR	G I	G. control
Blanco cristalino	-	11.1%
Blanco opaco	77.8%	77.8%
Blanco lechoso	22.2%	11.1%
Total	100 %	100 %
ASPECTO	G I	G. control
Líquido	11.2%	44.4%
Semi viscoso	44.4%	55.6%
Viscoso	44.4%	-
Muy viscoso	-	-
Total	100 %	100 %

4.1.2. Características seminales de animales tratados con Oxitocina (GII).

Tabla 9
Características seminales cuantitativas de alpacas tratadas con oxitocina (G II).

GRUPO	VOLUMEN (mL)	pH	CONCENTRACION (millones/mL)	VITALIDAD %	MOTILIDAD %	ENDOSMOSIS %	ANORMALIDADES %
G II (Oxitocina)	1.967 ^a	8.02 ^a	78 555 555.56 ^a	65.778 ^a	28.889 ^a	17.667 ^b	33.000 ^a
Grupo control	2.922 ^a	7.89 ^a	66 444 444.44 ^a	76.667 ^a	42.222 ^a	22.000 ^{ab}	26.222 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadística entre características seminales evaluadas (P<0.05)

Tabla 10
Características seminales cualitativas de alpaca del grupo II.

COLOR	G II (Oxitocina)	Grupo control
Blanco cristalino	11.1%	11.1%
Blanco opaco	66.7%	77.8%
Blanco lechoso	22.2%	11.1%
Total	100 %	100 %
ASPECTO	G II	G. control
Líquido	22.2%	44.4%
Semi viscoso	44.6%	55.6%
Viscoso	22.2%	-
Muy viscoso	11.1%	-
Total	100 %	100 %

4.1.3. Características seminales de animales tratados con Oxitocina + GnRH (GIII).

Tabla 11

Características seminales cuantitativas animales tratados con Oxitocina + GnRH (GIII).

GRUPO	VOLUMEN (mL)	pH	CONCENTRACION (millones/mL)	VITALIDAD %	MOTILIDAD %	ENDOSMOSIS %	ANORMALIDADES %
G III (Oxit. + GnRH)	1.075 ^a	8.27 ^a	11 625 000.00 ^b	37.000 ^b	3.000 ^b	5.250 ^c	29.000 ^a
Grupo control	2.922 ^a	7.89 ^a	66 444 444.44 ^a	76.667 ^a	42.222 ^a	22.000 ^{ab}	26.222 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadística entre características seminales evaluadas (P < 0.05)

Tabla 12

Características seminales cualitativas animales tratados con Oxitocina + GnRH (GIII).

CA COLOR	G III (Oxit. + GnRH)	Grupo control
Blanco cristalino	100%	11.1%
Blanco opaco	-	77.8%
Blanco lechoso	-	11.1%
Total	100 %	100 %
ASPECTO	G III	G. control
liquido	100%	44.4%
Semi viscoso	-	55.6%
Viscoso	-	-
Muy viscoso	-	-
Total	100 %	100 %

4.1.4. Concentración de testosterona sérica (ng/mL) en los tres grupos de estudio.

Tabla 13

Concentraciones promedio de testosterona sérica (ng/mL) en los tres grupo de de estudio (GI, GII y GIII).

N° de muestreo	HORA	GnRH^a (GI)	Oxitocina^b (GII)	GnRH+Oxit^{ab} (GIII)	Grupo control^c
1	0 min	1.3752	5.73873	2.3412	1.9127
2	15 min	4.0909	4.2277	2.2302	1.8289
3	30 min	4.62245	6.5451	4.4379	1.43347
4	45 min	6.38803	7.325767	4.57163	1.39933
5	60 min	15.2745	2.726	5.02093	1.12593
6	75 min	7.7589	4.027567	5.2488	1.013067
7	90 min	6.70803	3.1627	3.9817	0.611467
8	105 min	6.758267	2.49983	11.015067	0.808
9	120 min	6.037867	2.8145	2.91363	0.5874
10	135 min	6.232967	1.8348	3.378667	1.039267

Letras diferentes indican diferencia estadística entre características seminales evaluadas (P<0.05)

4.2. DISCUSION

4.2.1. VOLUMEN SEMINAL DE ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

El volumen del eyaculado de machos tratados con GnRH tuvo un promedio de 1.76 mL, con valores que van desde 0.4 a 4.0 mL, este valor se encuentra dentro de los rangos descritos por otros autores, (Dávalos y Olazábal, 2002; Galindo, 1995; Bravo, 1997) quienes también obtuvieron el semen mediante la técnica de vagina artificial, el promedio se encuentra ligeramente inferior al grupo control donde se reporta 2.92 mL (anexo 7).

Este volumen ligeramente inferior al grupo control podría deberse a que el incremento de testosterona sérica saturó los receptores a testosterona, iniciando la transformación a dihidrotestosterona (O'Donnell *et al.*, 2006), la cual actúa en el proceso de erección y eyaculación, y al incrementarse la concentración sérica de dihidrotestosterona, la eyaculación completa sucedió más rápido y en menor tiempo (Bhasin y Benson 2006) o simplemente se deba a la alta variabilidad reportada anteriormente en alpacas machos (Bravo, 1998).

La aplicación de GnRH se hizo una hora antes de la colección de semen por lo que hubo tiempo suficiente para que esta hormona provoque incremento del libido mediante la elevación de la testosterona sérica, acelerando el eyaculado en menor volumen, pues en este grupo el pico de testosterona estuvo a los 60 minutos post aplicación hormonal, pero esta influencia no fue significativa.

El volumen promedio de eyaculados obtenidos de alpacas tratadas con oxitocina fue de 1.97 ml, con valores de 0.7 a 4.5 ml, este valor se encuentra

dentro del rango descrito para la especie en investigaciones previas, es ligeramente inferior a lo reportado en el grupo control.

La oxitocina está regulada por la acción de la hormona LH, la cual incrementa la actividad secretoria de la próstata (Frayne y Nicholson, 1994), incrementando su volumen de secreción. Sin embargo, en la presente evaluación se observó un menor volumen eyaculatorio, demostrando que en la alpaca no existe esta acción ó que probablemente no haya causado este incremento de volumen por la alta dosis aplicada (50 UI), causando un estado refractario, disminuyendo las secreciones de las glándulas anexas, puesto que en ovinos se indica un mayor volumen seminal al aplicar 10 μ g (Nicholson, 1996; Nicholson *et al.*, 1999) o 5 UI de oxitocina endovenosa (Bozkurt *et al.*, 2007).

El volumen de semen post aplicación de GnRH + Oxitocina fue el menor registrado en todos los grupos, observándose 1.075 ml, siendo también inferior a los demás reportes, pero se encuentra dentro de los rangos de otros autores antes mencionados (Dávalos y Olazábal 2002; Galindo, 1995; Bravo, 1997), posiblemente pueda deberse a que la aplicación de las dos hormonas intramuscularmente causó dolor regional de los cuartos traseros, y causó incomodidad y dolor durante la posición de copula en esta especie, produciendo montas cortas con pequeños volúmenes seminales, posiblemente eyaculaciones incompletas, que también afectó los otros parámetros seminales evaluados en el presente trabajo, por lo cual solo existió cuatro eyaculados en 9 intentos de colección.

El volumen del eyaculado de alpacas del grupo control tuvo valores extremos como 0.5 ml y 9 ml, con un promedio de 2,92 ml, los cuales se

encuentran dentro de los rangos descritos por otros autores quienes también obtuvieron semen mediante vagina artificial (Bravo, 2002; Sumar, 2000; Quispe, 1987; Huanca y Gauly, 2001), se debe tener en cuenta que las colecciones se realizaron una vez por semana y no hubo efecto de colecciones repetidas que pudieran afectar el volumen colectado; este volumen es ligeramente superior a lo reportado por (Pérez, 1997; Rivera, 1998; Galindo, 1995), posiblemente porque dichos autores trabajaron utilizando vagina artificial sin la frazadilla eléctrica para mantener la temperatura constante, siendo este un factor controlado en el presente trabajo. Los resultados hallados son inferiores al rango reportado por (Sumar y Leyva, 1981) posiblemente debido a que dichos autores trabajaron al inicio de la época reproductiva en animales sin entrenamiento previo y que solo donaron semen una sola campaña, además reportan que dichos animales se encontraban separados de las hembras y en abstinencia sexual, a diferencia de nuestros animales que tuvieron una rutina de colección semanal continua, además que en algunas ocasiones montaron hembras como parte de otros trabajos de investigación llevados en el CIP Quimsachata.

4.2.2. COLOR SEMINAL DE ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

El color del semen fue mayormente blanco opaco para los grupos GnRH, oxitocina y control, observándose el color blanco lechoso en el segundo lugar y se encontró blanco cristalino en menor cantidad para los grupos control y oxitocina, mientras que el 100 % de los casos en el grupo GnRH + oxitocina fueron de color blanco cristalino, como se observa en las tablas 8, 10 y 12. Se

observó que pocas muestras mostraron color blanco lechoso, diferente al reporte de (Sumar y Leyva, 1981) quienes indican que todos los eyaculados son blanco lechoso. No se observó ninguna muestra de color blanco cremoso, a diferencia del reporte de (Galindo, 1995); se debe considerar que en el presente trabajo la determinación del color la hizo una sola persona en todas las ocasiones, para de esta manera evitar la alta variabilidad entre individuos evaluadores.

Las muestras de semen colectado después de la aplicación de GnRH tuvieron mayoritariamente un color blanco opaco, el cual estuvo presente en el 77.8 % de las muestras, mientras que el 22.2 % de las muestras tuvieron un color blanco lechoso, similar a lo reportado por (Urquieta *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2002) y al grupo control, evidenciando que fueron eyaculados completos. La mayor proporción del color blanco opaco estaría relacionado a la concentración, así como se indica en reportes anteriores (Urquieta *et al.*, 2005), observando la diferencia entre los eyaculados del grupo I con los eyaculados del grupo III, en el cual existe una bajísima concentración y este presenta color blanco cristalino en su totalidad.

Los eyaculados obtenidos luego de la aplicación de oxitocina fueron en un 66.7 % de color blanco opaco, el 22.2 % fue de color blanco lechoso y el 11.1 % fue blanco cristalino, estas observaciones son consistentes con lo descrito por (Urquieta *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2002) quienes también indican que el color predominante es el color blanco opaco y que este estaría relacionado a la concentración espermática, evidenciando la diferencia con el grupo III. Los resultados encontrados son similares al grupo control indicando que se encuentra en su rango fisiológico.

En el grupo GnRH + Oxitocina el color observado fue blanco cristalino en todos los casos, similar al reporte de (Quispe, 1987) quien reportó también una baja concentración espermática (tabla 1).

El color del semen podría estar relacionado a la concentración, pues este parámetro estuvo muy por debajo de los otros grupos en estudio, inferior a los reportes de otros autores (Urquieta *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2002), y posiblemente se deba a que fueron eyaculados incompletos y/o solo se trato de plasma seminal o de liquido prostático, lo que se estaría evidenciando en su aspecto aguado y bajísima concentración.

El color de los eyaculados de alpaca colectados en el grupo control fue en su gran mayoría de color blanco opaco, registrándose el 77.8 % de los eyaculados de este color y solo el 11.1 % fue blanco lechoso y el 11.1 % restante fue blanco cristalino, similar a lo reportado por (Urquieta *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2002) quienes indican relación con la concentración espermática, la cual también es similar al presente grupo.

4.2.3. ASPECTO SEMINAL DE ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

Los eyaculados colectados luego de la aplicación de GnRH tuvieron el 44.4 % de muestras viscosas, el 44.4 % de muestras semi viscosas y solo el 11.2 % de muestras de aspecto liquido, similar a lo reportado anteriormente en llamas (Fernández *et al.*, 2003) quienes indican estas tres categorías de viscosidad y que los eyaculados de llama presentaban todas las categorías descritas. Se asume que la aplicación de GnRH indujo una mayor secreción de fluidos de las glándulas anexas, que son las responsables de la viscosidad del

semen (Garnica *et al.*, 1993), especialmente de secreciones de las glándulas bulbouretrales (Vino *et al.*, 2003).

Los eyaculados de alpacas tratadas con oxitocina tuvieron gran variación en cuanto a su aspecto, observándose que el 11.1 % fue muy viscoso, el 22.2 % fue viscoso, el 44.5 % fue semi viscoso y el 22.2 % fue de aspecto líquido (muy poco viscoso), como se observa es el único grupo que presentó semen muy viscoso, lo cual podría deberse a que la oxitocina tiene efecto sobre las células mioepiteliales testiculares, pero también existe músculo liso en próstata y bulbouretrales, las cuales producen el plasma seminal, las cuales estimuladas por la oxitocina exógena estarían produciendo mayor cantidad de proteínas causantes de la viscosidad (Roser, 2001; Bravo *et al.*, 1996; Garnica, *et al.*, 1993; Vino *et al.*, 2003) siendo necesaria la evaluación bioquímica del plasma seminal para determinar cambios en su composición química, la cual podría estar causada por la oxitocina exógena.

El aspecto del semen de los machos tratados con GnRH + Oxitocina fue líquido en todos los casos, evidenciando una pobreza en su característica de concentración, posiblemente porque solo se trataría de la secreción de la próstata, pues al no haber viscosidad se asume que no existió la secreción de las glándulas bulbouretrales, la cual estaría relacionada a las proteínas que producen viscosidad en el plasma seminal (Vino *et al.*, 2003; Garnica *et al.*, 1993; las muestras de semen también podrían estar contaminada con orina, por lo que se observan de aspecto líquido, evidenciándose al observar el pH tan alcalino (≈ 8).

De los 9 eyaculados del grupo control, se encontró que el 55.6 % de las muestras fueron semi viscosas, similar al reporte de (Dávalos y Olazabal, 2002)

y el 44.4 % fueron de aspecto líquido, ninguna muestra fue descrita como viscosa ni líquida, a diferencia de lo reportado por (Fernández *et al.*, 2003) quienes reportaron un 21 % de alta viscosidad, pero es similar al mismo autor cuando reporta 44 % de viscosidad baja, diferente también a los reportes de (Sumar y Leyva, 1981; Quispe, 1987; Galindo, 1995; Huanca y Gauly, 2001; Rivera, 1998), quienes reportan que el semen de la alpaca es solamente viscoso, habiendo obtenido todos estos autores el semen mediante la misma técnica del presente trabajo (vagina artificial).

4.2.4. pH SEMINAL DE ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

El pH de las muestras de semen de animales tratados con GnRH va desde 6.95 a 8.33, con un promedio de 7.65, el que se encuentra ligeramente superior a reportes anteriores, pero es similar al promedio del grupo control, lo cual estaría indicando que se encuentra dentro del pH fisiológico, similar al reporte de (Bravo, 1997), quien indica un pH de 7.8.

El pH encontrado en eyaculados post aplicación de oxitocina tuvo valores que fueron desde 6.91 a 8.83, con un promedio de 8.02, este valor es superior a los reportes anteriores e incluso al grupo control, podría estar indicando una contaminación con orina pues se sabe que la oxitocina estimula la musculatura lisa (Thackare *et al.*, 2006), la cual se encuentra en la uretra y la vejiga urinaria, elevando estos valores por contaminación.

El valor de pH encontrado en los machos tratados con GnRH + Oxitocina es el más alto, pudiendo deberse a una posible contaminación con orina (Huamantuco, 2005), lo que concuerda a su aspecto líquido, color blanco

cristalino y baja concentración espermática con muy pequeña motilidad, pH superior al valor normal reportado anteriormente (Bravo, 1997; Rivera, 1998; Cárdenas *et al.*, 1987).

Se encontró un pH promedio de 7.89 en el semen del grupo control, con valores extremos de 7.01 a 8.39, estos valores son ligeramente superiores a reportes anteriores de semen de alpaca colectado por vagina artificial (Cárdenas *et al.*, 1987; Bravo, 1997), lo cual podría estar indicando contaminación con orina (Huamantuco, 2005), pero es similar al reporte hecho por (Rivera, 1998) quien indica 7.91.

4.2.5. CONCENTRACION ESPERMATICA DE ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

La concentración de espermatozoides en el grupo de animales tratados con GnRH se incrementó, observándose un promedio de 110 388 889.9, con valores que van desde 28 000 000 a 227 000 000, siendo superior a lo reportado por (Bravo, 1997) quien indica una concentración de 56 200 000 espermatozoides /mL, también es superior al grupo control, indicando que la aplicación de GnRH induce una mayor liberación de espermatozoides en el eyaculado, similar a lo reportado en camellos por (Willmen *et al.*, 1992), quien indica un incremento de la concentración espermática post aplicación de 10 µg de GnRH exógena, mejorando de esta manera la calidad seminal en cuanto a su concentración espermática.

La GnRH exógena produjo, vía LH, la liberación de altas cantidades de testosterona, la cual regula y mantiene la espermatogénesis, así como también actúa en el proceso de eyaculación, causando la liberación de un mayor

número de espermatozoides almacenados en los reservorios espermáticos en el macho (Bravo *et al.*, 2003), siendo este efecto retardado, como se observa en sucesivas colecciones semanales. La GnRH produce liberación de LH, la cual a su vez incrementa la liberación de testosterona, la cual se biotransforma en estrógeno gracias a la α -5 aromatasas, este estrógeno actúa presensibilizando los receptores oxitócicos de la musculatura lisa del conducto deferente y del epidídimo (Senger, 2003), causando una mayor contracción y produciendo liberación de una mayor cantidad de espermatozoides, lo cual incrementó la concentración espermática.

La alpaca, considerada una especie con reproducción estacional, presenta variaciones estacionales a lo largo del año en cuanto a su concentración sérica de testosterona, la cual se incrementa artificialmente mediante la aplicación de GnRH exógena lo cual estaría acelerando el proceso de la espermatogénesis estacional (Sumar, 2000).

La concentración promedio de espermatozoides en los animales tratados con oxitocina fue de 78 611 111.1 de espermatozoides, con valores extremos de 14 000 000 a 194 000 000, siendo superior al grupo control, similar a lo reportado en toros y carneros tratados con oxitocina (Voglmayr, 1975; Berndtson e Igboeli, 1988) quienes también obtuvieron incremento en la concentración espermática post aplicación de oxitocina; nuestro reporte es inferior a los valores encontrados en el grupo de GnRH, siendo similar a reporte anteriores (Nicholson *et al.*, 1999; Frayne y Nicholson, 1994) quienes indican que aplicaciones de 10 μ g de oxitocina incrementa significativamente la concentración espermática en carneros, probablemente al incrementar las contracciones de las células mioepiteliales del epidídimo y del conducto

deferente (Roser, 2001) y aplicaciones de solo 5 UI de oxitocina también causan incremento de la concentración espermática en carneros (Bozkurt *et al.*, 2007), dosis de 50 UI de oxitocina incrementa la concentración en toros (Berndtson e Igboeli, 1988).

En el grupo de GnRH + Oxitocina estuvo la menor concentración encontrada entre todos los grupos de estudio, presentando un promedio de 11 625 000.0/ml, posiblemente debido a que solo fue secreción prostática y no semen entero. Se asume que las acciones de la GnRH y la oxitocina exógena estarían inhibiéndose mutuamente ó estarían compitiendo en cuanto a receptores y no causarían su acción, ó posiblemente se colectó solamente plasma seminal pues el gran volumen de hormona aplicado vía intramuscular causó dolor a los machos, entonces las copulas fueron cortas y los eyaculados fueron incompletos y pobres en cuanto a su concentración (Nicholson, 1996) además que estos eyaculados habrían estado contaminados con orina, como lo evidencian otras características seminales disminuidas (Huamantuco, 2005).

La concentración de espermatozoides en el grupo control tuvo un promedio de 66 444 444.44/mL, encontrándose gran variabilidad que fue desde 18 500 000 hasta 129 000 000/ml, esta concentración se encuentra dentro del rango reportado por (Bravo, 1997; Sumar y Leyva, 1981), quien también indican gran variabilidad entre machos y aun dentro del mismo individuo; siendo superior a lo reportado por otros autores (Cardenas *et al.*, 1987; Quispe, 1987; Huanca y Gaulty, 2001; Galindo, 1995; Rivera, 1998) quienes también colectaron semen por el método de vagina artificial.

4.2.6. VITALIDAD ESPERMÁTICA DE ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

La vitalidad de los espermatozoides eyaculados luego de la aplicación de GnRH fue de 64.4 %, con valores que van desde 36 a 88 %, este promedio se encuentra dentro del rango de vitalidad descrito para esta especie, siendo ligeramente inferior al grupo control. La testosterona actúa sobre la producción y secreción prostática, la próstata produce glicerilfosforilcolina, que actúa como substrato energético inmediato para el espermatozoide, en cantidades séricas elevadas la testosterona podría causar una variación en la secreción prostática reduciendo esta liberación de glicerilfosforilcolina y causando mortalidad espermática (Brisdbidger y Taylor, 2006).

La vitalidad del grupo tratado con oxitocina tuvo un promedio de 65.7 %, con valores que van desde 46 a 77 %, siendo ligeramente inferior al grupo control y similar al grupo de GnRH, lo cual nos llevaría a pensar que existe algún efecto de la oxitocina en esta disminución de espermatozoides vivos, posiblemente causada a alguna alteración en la composición bioquímica del plasma seminal, pues esta hormona influye en la contracción de células musculares lisas que se encuentran en las vías eyaculatorias, alterando la secreción de carbohidratos que son los substratos energéticos utilizados por los espermatozoides, disminuyendo la vitalidad (Garnica *et al.*, 1993; Bravo, 2002).

La vitalidad encontrada en los eyaculados de animales tratados con GnRH + Oxitocina fue la menor de todos los grupos del presente estudio, debido posiblemente a que no se trataría de semen entero o que este

altamente diluido con orina, pues se sabe que la presencia de orina causa mortalidad espermática (Huamantuco, 2005).

La vitalidad espermática encontrada en eyaculados de semen entero del grupo control tuvo un promedio de 76.6 %, con valores que van desde 63 a 87 %, siendo superiores a lo reportado por (Bravo, 1997; Galindo, 1987) quienes trabajaron en centros experimentales ubicados en puna húmeda, la cual presenta mejores condiciones medioambientales que el presente trabajo, el que es un factor de variabilidad, por lo que es similar al reporte de (Dávalos y Olazabal, 2002) que trabajaron en el mismo centro experimental del presente trabajo de investigación, dicho reporte indica 72 % en eyaculados obtenidos por vagina artificial combinado con hembra receptiva, lo cual incrementó la vitalidad de dichos eyaculados, este resultado podría deberse a que los animales utilizados en este trabajo tuvieron más de tres campañas como donadores de semen mediante vagina artificial, por lo tanto ya están entrenados y acostumbrados al proceso de colección; los resultados de vitalidad espermática son superiores a reportes anteriores de semen de alpaca colectado por vagina artificial (Quispe, 1987; Galindo, 1995; Rivera, 1998) posiblemente debido a que en dichos trabajos utilizaron vagina artificial sin frazadilla eléctrica para mantener la temperatura estable, pudiendo haber causado muerte espermática por shock térmico frío.

4.2.7. MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

Los espermatozoides del grupo post aplicación de GnRH presentaron una motilidad de 45.22 %, con valores que van desde 22 a 60 %, esta baja

motilidad podría deberse a que un mayor porcentaje de los eyaculados fueron viscosos y semiviscosos, lo cual no permite que exista motilidad de avance y solamente se observa motilidad oscilatoria (Sumar, 1983); a diferencia de los reportes de (Bravo, 1997; Davalos y Olazabal, 2002) la motilidad es inferior, posiblemente debido a que dichos informes fueron de semen entero y sin la acción de hormonas exógenas; este porcentaje de motilidad es similar a la motilidad descrita en el grupo control. Al igual que en la vitalidad, la motilidad espermática se sustenta en la cantidad de substratos energéticos de reserva como la fructosa y la glucosa en alpacas (Garnica et al., 1993), la elevación de testosterona podría estar causando una variación en la composición de las secreciones de las glándulas anexas sexuales del macho y estaría causando esta reducción en la motilidad (Brisdbidger y Taylor, 2006).

La motilidad encontrada en el grupo tratado con oxitocina tuvo un promedio de 28.2 %, con valores que van desde 10 a 50 %, este valor es inferior a los dos grupos anteriores, así como está muy por debajo de los reportes de (Bravo, 1997; Dávalos y Olazabal, 2002), y es ligeramente inferior a lo reportado por (Quispe, 1987; Rivera, 1997), todos los reportes anteriores fueron de semen entero sin aplicación de ninguna hormona exógena, por lo que asumimos que la oxitocina exógena estaría afectando la motilidad espermática, posiblemente por estar causando alteración de la secreción del plasma seminal, sobre todo en su concentración de substratos energéticos necesarios para la motilidad espermática.

Este valor guarda relación con la vitalidad, puesto que así como existen pocas células espermáticas vivas, también la motilidad se ve disminuida en este grupo experimental, siendo diferente al reporte de (Nicholson *et al.*, 1999) quien

indica que sí existe un incremento en la motilidad de espermatozoides de ovino tratados con 10 ug de oxitocina y es también diferente a lo observado en semen de equinos, donde se determino la presencia de oxitocina en el plasma seminal y que esta oxitocina causa la motilidad espermática (Watson *et al.*, 1998), de la misma manera al reporte de (Bozkurt *et al.*, 2007) quien con solo 5 UI de oxitocina mejoró la motilidad de espermatozoides en carneros, posiblemente en la alpaca, al igual que el caballo, la oxitocina se acumule en el plasma seminal y solo se libere y actúe sobre los espermatozoides en el momento de la migración espermática hacia la unión uterotubal, por lo cual la motilidad se observa disminuida en la colección por vagina artificial (Watson *et al.*, 1998).

La motilidad en el grupo tratado con GnRH + Oxitocina fue demasiado pobre, solo de 3 %, lo cual concuerda con lo hallado en el pH del mismo grupo, pues se sabe que la motilidad espermática es afectada por variaciones del pH del plasma seminal, posiblemente por una contaminación con orina (Huamantuco, 2005), causando este porcentaje de motilidad tan bajo.

La motilidad reportada en espermatozoides de eyaculado completo del grupo control presenta gran variabilidad, puesto que se reportaron datos que van desde 10 a 75 %, obteniendo un promedio de 42.2 %, este dato se encuentra por debajo de los reportes de (Bravo, 1997; Dávalos y Olazabal, 2002) posiblemente debido a que nuestro reporte esta hecho en base a solo 9 colecciones, lo cual afecta de manera negativa al promedio general, pues los reportes anteriores se realizaron con mayor numero de eyaculaciones y este factor disminuye la variabilidad de los resultados.

La motilidad del grupo control es ligeramente inferior a lo reportado por (Quispe, 1987; Rivera, 1997) pero está dentro del rango descrito por (Cárdenas *et al.*, 1987) esta alta variabilidad de los resultados encontrados en motilidad estaría reflejando las diferencias de manejo del semen utilizado en la evaluación, pues en los reportes mencionados que datan de la década de 1980-1990 y en los lugares donde fueron realizados, se sabe que utilizaron un mechero de alcohol para mantener la temperatura de la lamina portaobjetos y que esta temperatura no era constante sino que tenia elevaciones y descensos bruscos, lo cual podría haber causado incremento de la respuesta de motilidad espermática, alterando los resultados.

4.2.8. ENDOSMOSIS ESPERMÁTICA DE ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

El porcentaje de endosmosis en el grupo tratado con GnRH fue de 34.4 %, con valores que van desde 27 a 47 %, este porcentaje es ligeramente superior a lo descrito en el grupo control, posiblemente por efecto de la hormona exógena, pues alta concentración de testosterona sérica estaría causando una alteración de la composición química de las secreciones prostáticas y bulbouretrales (Garnica *et al.*, 1993), este semen fue más fluido que el control, indicando que no se produjeron en la cantidad necesaria las proteínas que forman el coagulo, haciendo que los espermatozoides no se cubran con estas proteínas y puedan interactuar más libremente con la solución hipoosmótica, obteniéndose esta elevación en su respuesta endosmótica, tal como se reportó en semen de llamas obtenido por electroeyaculación, el cual es menos viscoso que el obtenido por vagina

artificial, además que se utilizó solución hipoosmótica de 150 mosmol, a diferencia de otros autores quienes en semen de llama utilizaron soluciones de 50 y 100 mosmol (Director *et al.*, 2007; Giuliano *et al.*, 2007^a; Giuliano *et al.*, 2007^b).

El porcentaje promedio de endosmosis encontrado en el grupo tratado con oxitocina fue de 28.7 %, con valores que van desde 5 a 36 %, siendo superior al grupo control e inferior al grupo de GnRH, además que se encuentran por debajo de los autores argentinos que reportaron en llamas (Director *et al.*, 2007; Giuliano *et al.*, 2007). El porcentaje de espermatozoides positivos a endosmosis está relacionado a la capacidad de la membrana espermática de interactuar con su medio ambiente, en esta ocasión con una solución hipoosmótica, pero teniendo en cuenta que los espermatozoides están recubiertos por proteínas propias del plasma seminal, el cual es altamente viscoso (Bravo *et al.*, 1996; Bravo, 2002), esta interacción no puede ser posible, produciendo baja respuesta endosmótica, también posiblemente por utilizar solución hipoosmótica de 150 mosmol a diferencia de lo utilizado en llamas que es de 50 y 100 mosmol (Director *et al.*, 2007; Giuliano *et al.*, 2007^a; Giuliano *et al.*, 2007^b).

Hubo bajísima respuesta al test hipoosmótico en el grupo de GnRH + oxitocina, el presente resultado estaría afectado por el alto valor de pH, la baja vitalidad y baja concentración, pues para encontrar respuesta al test hipoosmótico deben incubarse espermatozoides vivos con una solución hipoosmótica (Jeyendran *et al.*, 1984), y como es evidente en las muestras obtenidas, la bajísima vitalidad disminuyó el porcentaje de respuesta endosmótica, además que de haber una contaminación con orina esta estaría

aportando solutos alterando la miliosmolaridad del medio, por lo cual la respuesta endosmótica de este grupo fue casi nula.

La endosmosis o la capacidad de restablecer el equilibrio osmótico por la membrana de la cola del espermatozoide no está aun reportado en alpacas, se encontró que existe un bajo porcentaje de endosmosis, teniendo en el grupo control un promedio de 22 %, con valores que van desde 10 al 37 %, posiblemente se deba a la presencia de mucopolisacaridos del plasma seminal (Garnica *et al.*, 1993), que estén impidiendo la interacción de las membranas espermáticas con el medio que lo rodea; reportes de endosmosis en espermatozoides de llama indican también bajos porcentajes de reacción, así tenemos desde 31 a 36 % en espermatozoides obtenidos por vagina artificial (Giuliano *et al.*, 2007) y 59 % en semen obtenido por electroeyaculación (Director *et al.*, 2007), además se debe tener en cuenta que los trabajos en semen de llamas fueron hechos con solución hipoosmotica de 50 y 100 mosmol y el presente trabajo se hizo con solución hipoosmotica de 150 mosmol, por lo cual obtuvimos menores respuestas.

4.2.9. ANORMALIDADES ESPERMATICAS EN ANIMALES TRATADOS CON GnRH (GI); OXITOCINA (GII) Y OXITOCINA + GnRH (GIII)

El porcentaje de espermatozoides anormales en eyaculados de alpacas tratadas con GnRH presenta un promedio de 27.2 %, con valores que van desde 15 a 42 %, estos valores son ligeramente superiores a reportes previos (Davalos y Olazabal, 2002; Galindo, 1995) quienes también utilizaron la tinción de Hancock para esta determinación, la cual no estaría correcta según reportes argentinos en semen de llama (Giuliano *et al.*, 2007; Carretero *et al.*,

2009) quienes indican que esta tinción no llega a tener contacto con todos los espermatozoides sino que se adhiere y tiñe fracciones de coagulo alrededor de los espermatozoides y estaría causando lecturas erradas, por lo que sugieren la aplicación de otras técnicas como las técnicas de fluorescencia ó de adecuar una tinción al tipo de semen, por lo cual nosotros utilizamos Tinción de Eosina/nigrosina en concentración adecuada al semen de humanos por ser un tipo de semen con aspecto similar al semen de alpaca (ver anexo 23); pero nuestro reporte es similar al reporte de (Bravo, 1997) quien reporta 27.7 %, siendo además similar a lo indicado en camellos tratados con GnRH, donde se vio el incremento de espermatozoides anormales en el eyaculado (Willmen *et al.*, 1992).

El porcentaje de espermatozoides anormales en el grupo de oxitocina se eleva ligeramente en relación a los dos grupos anteriores, presentando 33 %, con valores que van desde 20 a 60 %, este incremento de anormales podría deberse a que la oxitocina causa un vaciamiento de las reservas espermáticas como el conducto deferente y las ampollas del deferente (Bravo *et al.*, 2003) mediante el incremento de la tonicidad de las células mioepiteliales que se encuentran en estos conductos espermáticos (Frayne y Nicholson, 1994; Thackare *et al.*, 2006), por lo cual llegan al eyaculado células espermáticas aun inmaduras, lo que incrementa el porcentaje de anomalías (Roser, 2001).

El porcentaje de espermatozoides anormales en los eyaculados obtenidos de animales tratados con GnRH + Oxitocina se encuentra dentro del rango descrito en los otros grupos de estudio y es similar a reportes anteriores hechos por otros autores, al ser esta la única característica seminal que se encuentra dentro de los rangos descritos por otros autores (Dávalos y Olazábal

2002; Galindo, 1995; Bravo, 1997), podemos asumir que el problema con los anteriores parámetros seminales fue la contaminación con orina.

El porcentaje de espermatozoides anormales presenta gran variabilidad entre las diferentes colecciones e individuos del grupo control, así tenemos valores que van desde 14 a 44 %, con un promedio de 26.2 %, este valor se encuentra ligeramente superior a otros reportes previos, como los de (Dávalos y Olazabal, 2002; Galindo, 1987) quienes reportan valores con un rango entre 13.9 a 18.5 %, pero es similar al reporte de (Bravo, 1997), quien reporta 27.7 % de espermatozoides anormales, nuestro reporte es inferior al reporte de (Lichtenwalner *et al.*, 1996) quien reporta hasta 96.1 % en semen de llamas, debido a que se consideraba como anomalía a las cabezas sueltas y cabezas polimorfas, y durante el manejo de semen de alpacas siempre hay la posibilidad de causar desprendimiento de cabezas por lo que en el presente estudio no se consideró a las cabezas sueltas como anomalías y de acuerdo a un último trabajo sobre morfología de cabeza de espermatozoide de llama, ésta presenta cabezas polimorfas entonces tampoco se consideraron como anormales a las cabezas ligeramente diferentes (Cassaretto *et al.*, 2009).

4.3.- EFECTO DE LA GnRH, OXITOCINA Y GnRH + OXITOCINA SOBRE LA CONCENTRACION SERICA DE TESTOSTERONA.-

En el grupo tratado con GnRH, se observaron las mayores cantidades séricas de Testosterona, presentando un comportamiento diferente al grupo control, iniciando con una concentración que se encuentra dentro de lo descrito para la especie, pero a partir del minuto 15, inicia la elevación de la

concentración, llegando a su pico de concentración a los 60 minutos post aplicación de la hormona exógena, diferente al reporte de (Franco, 1997) quien indica el pico de testosterona a los 130 minutos post aplicación de 100 ug de GnRH exógena endovenosa y continua; a partir de los 60 minutos se inicia el descenso, pero continua con cantidades elevadas hasta la última hora de muestreo.

Los valores de testosterona encontrados en el grupo tratado con GnRH reflejan una gran actividad de la hormona exógena en la producción y liberación de testosterona sérica, siendo similar al grupo control a la hora 0, elevándose a los 15 minutos a 4.0909 ng/mL, a los 45 minutos sube a 6.38803 ng/mL y llegando a su pico de concentración a los 60 minutos con 15.2745 ng/mL, iniciando su descenso a los 75 minutos y a los 90 minutos los valores son casi iguales, sobre 6 ng/mL.

Se sabe que la vida media del acetato de busserelina es rápido, alrededor de 7 min, iniciando rápidamente su acción sobre la adenohipofisis y causando liberación de LH, la cual es seguida de una onda de testosterona, y como se vio anteriormente inicia su elevación a partir de los 15 min, llegando a su pico a los 60 min, estos niveles descienden pero se mantienen elevados hasta los 135 minutos, similar a los reportes de (Miller y Amman, 1986; Schambacher y Lunstra, 1977), quienes trabajaron con toros y carneros, describiendo también elevaciones de testosterona sérica después de la aplicación de GnRH exógena.

La mayor concentración de testosterona fue encontrada a los 60 minutos, lo cual es diferente a lo reportado por (Andaur *et al.*, 2003), quien en carneros obtuvo picos de testosterona a los 250 minutos, posiblemente porque este

autor aplicó dosis repetidas de pequeñas (0.002 mg) y grandes cantidades (0.12 mg) de análogo de GnRH, mientras que nosotros aplicamos una sola dosis de 50 µg por vía intramuscular, llegando en alta cantidad a la hipófisis causando liberación de LH, la cual indujo una oleada de testosterona a los 60 minutos. El pico de testosterona encontrado a los 60 minutos post aplicación de GnRH exógena es similar a lo reportado por (Aksoy *et al.*, 1993) quienes reportaron el pico de testosterona sérica a los 60 minutos de una única aplicación de 100 µg de GnRH vía endovenosa en carneros, posiblemente esta alta concentración aceleró el pico de testosterona pues en caso de alpacas aplicamos solo 50 µg de GnRH vía intramuscular, pero similar a lo reportado en carneros, la libido estuvo incrementada en todas las alpacas y todas las oportunidades de colección, confirmando que altas concentraciones de testosterona se bio-transforman en dihidrotestosterona, que es la hormona responsable de producir la libido (Senger 2003).

La aplicación de GnRH exógena causó la liberación de grandes cantidades de testosterona, la cual tuvo su pico a los 60 minutos post tratamiento, llegando a una concentración de 15.2745 ng/mL, similar a lo reportado luego de la aplicación de 10 µg de GnRH exógena a camellos bactrianos, donde (Willmen *et al.*, 1992) reportan 16.0 ng/mL, no indicando el tiempo, pero si indican que al igual que nuestras alpacas, presentaron mayor libido después del tratamiento hormonal.

Las concentraciones de testosterona en el grupo de oxitocina se encuentran elevadas, presentando escalonadamente tres picos en forma descendente, el primer pico se encuentra a los 45 minutos post aplicación de

hormona exógena, el segundo pico a los 75 minutos, y un tercer pico a los 120 minutos, de manera descendente.

El incremento de testosterona post aplicación de oxitocina exógena es evidente, observándose el pico a los 45 minutos post aplicación intramuscular, y otros dos picos menores a los 75 y 120 minutos, lo cual podría deberse a que la liberación de testosterona es producto de un pico previo de LH, la cual es regulada por la oxitocina, la cual a su vez es regulada por la testosterona, la cual ya incremento su concentración a los 45 minutos y esta retro alimentación produjo un segundo pico de testosterona a los 75 y otro pequeño pico a los 120 minutos (Frayne y Nicholson, 1994). No se ha determinado el efecto de la oxitocina exógena sobre la concentración de testosterona, pero al no influir sobre la concentración sérica de LH se indica que existiría otro sistema aun no determinado para explicar el efecto de la oxitocina exógena sobre las concentraciones séricas de testosterona (Nicholson *et al.*, 1991).

Un primer pico de testosterona sérica estaría produciéndose a causa de la liberación de LH producida a causa de la retroalimentación positiva causada por un incremento de testosterona intratesticular inducida por la oxitocina y/o por la posible acción de la oxitocina sobre la adenohipofisis de causar liberación de gonadotropinas, entre ellas LH, puesto que al ser un modulador de la esteroidogenesis estaría facilitando la producción de testosterona testicular y por consiguiente a la circulación general (Ivell y Russell, 1996), las observaciones decrecientes podrían deberse a la acción de esta oxitocina, la cual produce el incremento de la acción de la 5 α -reductasa, transformando la testosterona sérica en dihidrotestosterona y de esta manera la testosterona sérica estaría disminuyendo su concentración (Nicholson, 1996).

En el grupo combinado (GnRH+Oxitocina), las concentraciones de testosterona inician dentro de las cantidades normales descritas para la especie, pero a partir de los 30 minutos, inicia una elevación que se mantiene hasta los 90 minutos, presentando un pico visible a los 105 minutos post aplicación de la hormona exógena.

Los valores de testosterona sérica encontrados en el grupo tratado con GnRH + oxitocina presentan una curva bastante irregular en relación a los otros grupos en estudio, en este grupo se observa un pico a los 105 minutos post aplicación de GnRH y 30 minutos post aplicación de oxitocina, se observa un ligero incremento de testosterona sérica hasta los 90 minutos, lo cual podría deberse a la acción de la GnRH, similar a lo encontrado en toros y carneros tratados con GnRH exógena (Miller y Amman, 1986; Schambamcher y Lunstra, 1977) y también al grupo control. El pico de testosterona sérica a los 105 minutos podría deberse a una acción de retroalimentación de testosterona sérica que induce una pulsación de LH, causando este incremento de testosterona (Nicholson, 1996; Ivell y Russell, 1996).

En el grupo control, se observó la mayor concentración a la hora 0, disminuyendo ligeramente hasta el minuto 135, los valores encontrados en este grupo se encuentran en un rango que va desde 0.5 a 1.9 ng/mL.

Las concentraciones de testosterona sérica encontradas en el grupo control se encuentran similares a los reportes anteriores para alpacas adultas, presentando un rango que va desde 0.5874 a 1.9127 ng/mL, similar al reporte de (Losno y Coyotupa, 1983), quienes indican 1.502 ng/mL en alpacas de 12 meses, esa evaluación fue realizada mediante la prueba de RIA al igual que el presente trabajo, lo cual nos indicaría que no existe diferencia de la

concentración de testosterona sérica en animales de 12 meses y animales adultos usados en el presente trabajo de investigación, como lo indica (Chuna,1999), quien también mediante RIA, encontró un promedio de 1.4175 ng/mL.

Los animales utilizados en el presente estudio tenían edades comprendidas entre los 3 y 7 años de edad, por lo que se les considera adultos, aun así las cantidades encontradas en este grupo control son inferiores a las reportadas por (Carpio, 1999), quien encontró 5.385 y 5.247 en animales de 36 y 40 meses (\pm 3 años), posiblemente debido a que dicho autor utilizó el método de ELISA y no RIA, dicho método no es muy sensible para la determinación de hormonas esteroideas como si lo es el radioinmunoensayo (Matamoros, *et al.* 2002); también son inferiores a los datos conseguidos por (Pinares, 1990), quien informo haber encontrado valores de testosterona que van desde 3.44 a 8.80 ng/ml de suero sanguíneo, esto se podría deber a que como informó dicho autor, tuvo un mal manejo de las muestras, congelándolas y descongelándolas repetidas veces antes de su valoración, causando posiblemente alteración de la concentración de testosterona sérica.

La colección de las muestras se realizó durante el mes de marzo, similar al mes reportado para la evaluación de testosterona sérica en animales adultos realizada por (Sumar, 1990), quien encontró un promedio de 1.142 ng/mL, también determinado por el método de RIA, estos valores son inferiores a lo descrito por (Fowler, 2010), quien indica valores alrededor de 9.000 ng/mL durante época reproductiva en alpacas en Perú, mientras que indica valores de 1.200 ng/mL durante todo el año en el hemisferio norte, pero no indica la

metodología utilizada ni la edad de los animales muestreados por lo que estos datos no son consistentes.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Las características seminales del grupo tratado con GnRH se incrementaron visiblemente en concentración, vitalidad, motilidad y endosmosis.
2. Las características seminales en los animales del grupo tratado con oxitocina incrementaron en concentración, vitalidad, motilidad y endosmosis pero fueron inferiores al grupo tratado con GnRH.
3. Las características seminales estuvieron muy disminuidas en el grupo tratado con GnRH + oxitocina, incluso hubo oportunidades en que los animales no dieron semen y cuando lo dieron tuvieron características muy bajas.
4. Se observó un pico de testosterona del grupo I a los 60 minutos post aplicación de *GnRH*; el grupo II (oxitocina) presento valores elevados de testosterona, llegando a su pico a los 45 minutos post aplicación y el grupo III tuvo su pico a los 105 minutos post aplicación de GnRH + Oxitocina evidenciando que el tratamiento con dos hormonas exógenas interfieren en los procesos de eyaculación y liberación de testosterona.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

- Se observó que el tratamiento de alpacas con GnRH exógena mejoró sustancialmente las características seminales por lo que podemos recomendar su uso en una sola oportunidad.
- Realizar análisis histológico de testículos de alpacas tratadas con los protocolos hormonales propuestos en el presente trabajo.
- Realizar análisis seminales post aplicación de hormonas en dosis menores y por periodos prolongados.
- Realizar el análisis seminal y de testosterona sérica en un mayor número de alpacas tratadas con oxitocina y GnRH por más tiempo y verificar si existe algún efecto sobre la espermatogénesis subsecuente.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- AKSOY, M., T. TEKELI, K. COYAN, B. GÜVEN, M. ALAN, and A. AYAR. 1993. GnRH response test and libido scores in normal and lower quality sperm producing rams. *Reprod. Dom. Anim.* 28, 294-297.
- ALANOCCA F. 1978. Descripción de algunos aspectos macro-microscópico del aparato reproductor masculino de la alpaca (*Lama pacos*). Tesis MVZ-UNA-PUNO.
- ALLER, JF., GE. REBUFFI, AK. CANCINO, y RH. ALBERIO 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* 52: 15-23.
- AMMAN, RP. and BD. SCHAMBANCHER, 1983. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci.* 57, 2. 380-403.
- ANDAUR, M, A. SANTIANI y N. SEPÚLVEDA, 2003. Concentraciones plasmáticas de testosterona máxima en carneros como respuesta a la aplicación de GnRH. Resúmenes de II Reunión Anual de la Sociedad de Andrología y Gametología de Chile. Temuco. Chile.
- BERNDTSON, WE and G. IGBOELI, 1988. Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electroeyaculated after administration of oxytocin. *J. Reprod. Fertil.* 82; 467-475.

- BHASIN, S and GS. BENSON, 2006. Male sexual function. In: Knobil and Neill's. Physiology of reproduction. By: Neill, J.D. Third edition. Academic Press. St Louis USA.
- BOZKURT, T, G. TURK and S. GUR, 2007. Effects of exogenous oxytocin on serologic and seminal steroids and semen characteristics in rams. Turk J. Vet. Anim Sci. 31 (5); 303-309.
- BRAVO, PW y J. SUMAR, 1991. Ultrasonografía del aparato genital del macho llama y alpaca. Res 7 a Conv Int Especialistas en Camelid Sudamer. Argentina: Jujuy. p: 24.
- BRAVO, PW. 1995. Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. Camelids. Proceedings 257. Published by: post graduate foundation in veterinary science. University of Sydney. Australia.
- BRAVO, PW, J. MOSCOSO, C. ORDOÑEZ and V. ALARCON, 1996. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. Anim Reprod Sci. 43: 173-179.
- BRAVO, PW, D. FLORES and C. ORDOÑEZ, 1997. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. Biol of Reprod. 57, 520-524.
- BRAVO, PW. 1998. Avances en la fisiología reproductiva del macho llama y alpaca. XXI Reunión Científica Anual APPA. FMVZ-UNA-Puno.
- BRAVO, PW. 2002. The reproductive process of South American camelids. Seagull Printing, Salt Lake City. UT. USA.
- BRAVO, PW. 2003. Inseminación artificial en llamas y alpacas. Memorias del III Congreso Mundial sobre Camélidos. Potosí-Bolivia.

- BRAVO, PW, C. RADO, V. ALARCÓN Y C. ORDOÑEZ, 2003. Reservas espermáticas en la alpaca. Resúmenes del III Congreso mundial sobre camélidos. Potosí. Bolivia.
- BRISDBIDGER, G. and R. TAYLOR, 2006. Physiology of accessories glands in male: the prostate gland, the seminal vesicles and bulbourethral glands. In: Knobil and Neill's. Physiology of reproduction. By: Neill, J.D. Third edition. Academic Press. St Louis USA.
- BUENDÍA, P, C. SOLER, F. PAOLICCHI, G. GAGO, B. URQUIETA, F. PEREZ-SANCHEZ y E. BUSTOS-OBREGON, 2002. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm class analyzer computer-asisted system. Theriogenology 57, 1207-1218.
- CALZADA, J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. Editorial Jurídica S.A. Lima Perú.
- CÁRDENAS, M, M, VIVANCO y PW. BRAVO. 1987. Comparación de dos métodos de colección de semen en alpacas. X Reunión científica anual del APPA. UNA - PUNO Perú.
- CARPIO, M, C. ORDÓÑEZ, V. ALARCÓN y PW. BRAVO, 1999. Presencia de espermatozoides, niveles de testosterona, y tamaño testicular en alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Comisión Científica Nacional: UNSAAC. Cusco-Perú.
- CARRETERO, I, S. GIULIANO, C. CASARETTO, M. GAMBAROTTA and D. NEILD. 2009. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. Invet, 11(1), p 55-63.

- CASARETTO, C, M. MARTINES, S. GIULIANO, E. DE CELIS, I. CARRETERO y M. MIRAGAYA, 2008. Pruebas de correlación entre la viscosidad del eyaculado y variables espermáticas en la especie *Lama glama*. InVet nº 8 (1): 111-112.
- CASARETTO, C, S. GIULIANO, I. CARRETERO, D. LOMBARDO y M. MIRAGAYA. 2008. Evaluación del eyaculado de *Lama glama*: morfometría de cabezas del espermatozoide. Resultados preliminares. Invet. 8 (1) 152.
- CASARETTO, C, D. LOMBARDO, S. GIULIANO, I. CARRETERO, M. PINTO, V. TRASORRAS, J. EGEY VON THUNGEN, A. AGÜERO y M. MIRAGAYA, 2009. Morfometría de la cabeza espermática de llamas y guanacos. Resúmenes del V Congreso Mundial sobre Camelidos. Riobamba. Ecuador.
- CHUNA, P. 1999. Adherencias pene-prepuciales y niveles de testosterona circulantes en alpacas. Tesis para optar grado de magíster en producción y reproducción animal. Facultad de Medicina Veterinaria – UNMSM. PERÚ.
- CLARKE I.J. and S. POMPOLO, 2005. Synthesis and secretion of GnRH. Anim reprod Sci. 88, 29-55.
- DAVALOS R. y J. OLAZABAL, 2002. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Rev. Inv. Vet. Perú. 13 (2): 98-99.
- DESJARDINS, C. 1981. Endocrine signaling and male reproduction. Biol of Reprod. 24, 1-21.
- DEZA, H.W. 2004. Conservación de espermatozoides obtenidos a través del conducto deferente de alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) y

su posterior viabilidad. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNA-Puno. Perú.

DIRECTOR, A, S. GIULIANO, V. TRASORRAS, I. CARRETERO, M. PINTO and M. MIRAGAYA, 2007. Electroejaculation in llama (*Lama glama*). Journal of camel practice and research. Vol 14, nº 2, p 203-206.

DOBRANIC, T, M. SAMARDZIJA, M. CERGOLJ and N. PRVANOVIC, 2005. Determination of membrane integrity of canine spermatozoa. Veterinarski arhiv. 75 (1) 23-30.

FERNÁNDEZ, R, S, COPA. y JW. GUZMÁN. 2003. Efecto de edad y periodicidad de colección sobre características macro y microscópicas del semen de llama (*Lama glama*). Camélidos: Trabajos de Investigación. Universidad Católica Boliviana San Pablo. La Paz-Bolivia

FERNÁNDEZ BACA, S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. FAO. Santiago de Chile.

FLORES P, J. GARCIA-HUIDOBRO, C. MUÑOZ, E. BUSTOS –OBREGON y B. URQUIETA. 2002. Alpaca semen characteristics previous to a mating period. Anim Reprod Sci. Nº 72; 259-266.

FONSECA JF, CA. TORRES, VV. MAFFILI, AM. BORGES, ADF. SANTOS, MT. RODRIGUES. and RFM. OLIVEIRA. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. Anim Reprod. V2, n2, p 139-144.

FOWLER, ME. 2010. Medicine and surgery of camelids. Third edition. Willey-Blackwell. Iowa USA.

- FRAYNE, J and HE. NICHOLSON, 1994. Regulation of oxytocin production by purified adult rat leydig cells in vitro: effects of LH, testosterone and lipoproteins. *J of Endocrinol.* 145: 325-332.
- FRANCO, J.O. 1997. Función testicular en camélidos sudamericanos: evaluación funcional de las células de Leydig. I Symposium Internacional: Avances en reproducción de Rumiantes-APPA. UNMSM-Lima Perú.
- GALINDO, W. 1995. Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis Para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- GARNICA, J., G. ACHATA y PW. BRAVO. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci.* 32, 85-90.
- GIULIANO, S., MR. FERRARI, SE. SPIRITO, SH. CAMPI, A. DIRECTOR y H. FERNÁNDEZ. 2007a. avances en la implementación del test hipoosmotico (Hos test) en espermatozoides de llama. Avances de investigación. Fac.Cs.Vet. UBA. Buenos Aires. Argentina.
- GIULIANO, S., A. DIRECTOR, M. GAMBAROTTA, V. TRASORRAS and M. MIRAGAYA. 2007b. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci.* 104, 359-369.
- HAFEZ, ESE., MR. JAINUDEEN y Y. ROSNINA. 2002. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: HAFEZ ESE 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domésticos. 7° Edición. Editorial Interamericana-McGraw Hill. México.

- HAFEZ, ESE. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domésticos. 7° Edición. Editorial Interamericana-McGraw Hill. México.
- HUAMANTUCO, DM. 2005. pH de los órganos y glándulas anexas del aparato reproductor de alpacas machos. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista- FMVZ-UNA-Puno. Perú
- HUANCA, W y M. GAULY. 2001. Conservación de semen refrigerado de llamas. Rev. Inv. Vet. Perú. 1: 460-464.
- IVELL, R and JA. RUSSELL. 1996. Oxytocin: cellular and molecular approaches in medicine and research. Reviews of reproduction. 1: 13-18.
- JAEN, JL., V. BUSTINZA e V. IBAÑEZ. 1999. Peso y volumen testicular en la alpaca. Resúmenes del II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco-Perú. pp 56.
- JEYENDRAN, RS, HH. VAN DER VEN, M. PEREZ-PELAEZ, BG. CRABO and JD. ZANEVELT, 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fert. 70, 219-228.
- LICHTENWALNER, AB., GL. WOODS and JA. WEBER. 1996. Ejaculatory pattern of llamas during copulation. Theriogenology. 46: 286-291.
- LOSNO, W., J. COYOTUPA, J. SUMAR Y C. REYNAFARJE. 1983. Concentración de algunos esteroides circulantes en alpacas recién nacidas. Resúm Project Invest Realizadas por la UNMSM, Período 1975-1979. Lima. 2:115.
- LOSNO, W., y J. COYOTUPA. 1983. Niveles de testosterona sérica post coito en alpacas adultas. Resum Project Invest Realizadas por la UNMSM, Período 1975 - 1979. Lima. 2:114.

- MADHUKAR, D., and S. RAJENDER. 2009. Hormonal treatment of male infertility: promises and pitfalls. *J of Andrology*. Vol 30, n° 2. pp 95-112.
- MP Biomedicals. Testosterone DA Kit. For the quantitative determination of testosterone in serum or plasma. Kentucky USA.
- MATAMOROS, R., C. GÓMEZ y M. ANDAUR. 2002. Hormonas de utilidad diagnostica en medicina veterinaria. *Arch. Med. Vet.* XXXIV, n° 2, 167-182.
- MILLER, CJ. and RP. AMMAN. 1986. Effects of pulsatile injection of GnRH into 6-14 weeks olds Holstein bulls. *J Anim Sci.* 62, 1332-1339.
- MORTON, K., J. VAUGHAN and C. MAXWELL. 2008. Continued development of artificial insemination technology in alpacas. N° 08/057.rural industries research and development corporation. Australia.
- MURRAY, R., P. MAYES, D. GRANNER y V. RODWELL. 2001. *Bioquímica de Harper*. 15° Edicion. Editorial Manual Moderno. Mexico.
- NICHOLSON, HD., SE. GULDENAAR, GL. BOER and BT. PICKERING, 1991. Testicular oxytocin: efectos of intratesticular oxytocin in the rat. *J Endocrinology*. 112, 311-316.
- NICHOLSON, H. 1996. Oxytocin: a paracrine regulator of prostatic function. *Reviews of reproduction*. N° 1, 67-72.
- NICHOLSON, H, TJ. PARKINSON and KD. LAPWOOD. 1999. Effects of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep. *J Reprod Fertil*. 117, 299-305.
- O'DONELL, L., SJ. MEACHEM, PG. STANTON and RI. McLACHLAN. 2006. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Knobil and Neill's.

- Physiology of reproduction. By: Neill, J.D. Thirth edition. Academic Press.
St Louis USA.
- PACHECO, JI. 2008. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. REDVET, Vol IX, nº 4. pp 1-17.
- PADULA, AM. 2005. GnRH analogues – agonists and antagonists. Anim Reprod Sci. 88, 115-126.
- PASCO, ME. 2001. Desarrollo histológico testicular y características biométricas en alpacas desde el nacimiento al año de edad. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. FMV-UNMSM. Perú.
- PAWSON, AJ and AS. McNEILLY. 2005. The pituitary effects of GnRH. Anim Reprod Sci. 88, 75-94.
- PEÑA, E. 1994. Complementación al estudio anatomo-histológico de las glándulas accesorias del aparato reproductor de la alpaca macho huacaya (*Lama pacos*). Tesis Med. Vet. Zootec. UNA-Puno. Perú.
- PEREZ, G. 1997. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Desarrollo de la técnica. Actas del Segundo Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos. Córdoba, Argentina.
- PETRUNKINA, AM., D. WABERSKI, AR. GÜNZEL-APEL and K. TÖPFER-PETERSEN. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. Reproduction 134, 3-17.
- PINARES, CS. 1990. Radioinmunoanálisis de testosterona sérica y descripción del desarrollo sexual pre-puberal y puberal en alpacas. Tesis Univ. Nac. Agraria la Molina, Magíster Scientiae. Lima.
- QUISPE, F. 1987. Evaluación de las características físicas del semen de la alpaca durante la época del empadre. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.

- RIVERA, E. 1998. Uso de la yema de huevo y la glicerina en la sobre vivencia de los espermatozoides de alpaca. Tesis FMVZ-UNAPuno.Perú.
- ROJAS, E. 1998. Determinación de la temperatura testicular y su influencia sobre la espermatogénesis en alpacas de la raza huacaya. Tesis Med. Vet. Zootec. UNA-Puno. Perú.
- ROSENFELD, CS. 2007. Overview of male reproductive organs. In: Comparative Reproductive Biology. By: Schatten, H and Constantinescu, G. Blackwell Publishing. Iowa USA.
- ROSER, JF. 2001. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. Anim Reprod Sci. 68, 139-151.
- SATO, A y L. MONTOYA. 1990. Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*). Anatomia macroscopica. IVITA/CICCS. Lima Perú.
- SAS Institute Inc. 2009. SAS/STAT ® 9.2 Users guide, second edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SCHANBANCHER, BD and DD. LUNSTRA, 1977. Acute and chronic effects of gonadotropin releasing hormone on reproductive characteristics of rams during the nonbreeding season. J. Anim. Sci. 44, n° 4. pp 650-655.
- SENGER, PL. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. Second edition revised. Current Conceptions, inc. Pullman, Washington, USA.
- SERVICIO NACIONAL DE METEOROLOGIA E HIDROLOGIA-SENAMHI. 2009.
- SUMAR, J y V. LEYVA. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (lama pacos). Memorias de la IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas Chile.
- SUMAR, J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. Dep. Of

Obstetric and Gynecology. Swedish University of Agriculture Sciences and IVITA. Uppsala. Sweden

SUMAR, J. 1985. Fisiología reproductiva de la alpaca. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Boletín Científico de la Raya nº 1. p 36.

SUMAR, J., F. FRANCO Y V. ALARCÓN, 1990. Niveles de testosterona circulante en la alpaca (*Lama pacos*) y llama (*Lama glama*) en diversas estaciones del año. Memorias II jornada internacional de biopatología andina. Instituto de la altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima. Perú.

SUMAR, J. 2000. Llamas y Alpacas. En: Reproducción e inseminación artificial en animales, en: Hafez, E.S.E y Hafez, B. 7º Edición. Editorial Interamericana – McGraw-Hill. México.

SUTOVSKY, P and G. MANANDHAR. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: The Sperm Cell. By: De Jonge C. and Barratt C. Cambridge University Press. Cambridge UK.

THACKARE, H., H. NICHOLSON and K. WHITTINGTON. 2006. Oxitocin-its role in male reproduction and new potential. Therapeutic uses. Human Reproduction Update, Vol 12, nº 4. pp 437-448.

TIBARY, A and J. VAUGHAN. 2006. Reproductive physiology and infertility in male south american camelids: A review and clinical observations, Small Ruminant Research. Vol 61. pp: 283-298

URQUIETA, B., P, FLORES, C. MUÑOZ, E. BUSTOS-OBREGON Y J. GARCIA-HUIDOBRO. 2005. Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a mating period. Anim Reprod Sci. 90: 329-

- VALENCIA, L., A. SATO, L. MONTOYA y J. SUMAR. 1986. Revisión Anatómica de los Órganos Genitales Masculinos de la Alpaca (*Lama pacos*). Resumen 9ª Reunión Científica Anual Asociación Peruana de Producción Animal, Perú: Tingo María: R-9.
- VAUGHAN, J., D. GALLOWAY and D. HOPKINS. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australian government. 1-90p.
- VINO, LN, D, LARUTA y S. COPA. 2003. Componentes bioquímicos en la secreción de las glándulas bulbouretrales de llama. Camélidos: Trabajos de Investigación. Universidad Católica Boliviana San Pablo. La Paz-Bolivia. p 142.
- VOGLMAYR, JK. 1975. Output of spermatozoa and fluid by the testis of the ram and its response to oxytocin. J. Reprod. Fertil. 43: 119-122.
- WATSON, ED., E. NIKOLAKOPOULOS, C. GILBERT and J. GOODE. 1998. Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. Theriogenology. 51: 855-865.
- WILLMEN, T., H. SIEME, H. MERKT, F. SAAD, HO. HOPPEN and D. WABERSKY. 1992. Semen preservation and hormonal effects on semen quality in the camel. Reprod. Dom. Anim., 28, 91-96.
- ZAMBRANO, VR. 2009. Micro vascularización de las glándulas sexuales accesorias de la alpaca macho (*Lama pacos*). Tesis para optar el Título de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano. Puno Perú.

ANEXOS

ANEXO 1. Características seminales de alpacas del grupo GnRH.

MACHO	VOLUMEN	COLOR	ASPECTO	Ph	CONCENTRACION	VITALIDAD	MOTILIDAD	ENDOSMOSIS	ANORMALIDADES
Loco 166	3,5 ml	blanco opaco	Semi viscoso	8.33	42 000 000	77%	45%	32%	31%
Loco 166	0,5 ml	blanco opaco	Liquido	8	75 500 000	36%	22%	34%	41%
Loco 166	4,0 ml	blanco opaco	Semi viscoso	7.49	101 000 000	52%	55%	36%	15%
Caballo	2,0 ml	blanco lechoso	Semi viscoso	6.95	227 000 000	78%	50%	27%	18%
Caballo	1,0 ml	blanco opaco	semi viscoso	8.1	91 000 000	88%	45%	25%	20%
Caballo	3,0 ml	blanco opaco	Viscoso	7.31	215 000 000	47%	60%	47%	21%
Dominguillo	0,7 ml	blanco opaco	Viscoso	7.22	28 000 000	66%	25%	33%	27%
Dominguillo	0,4 ml	Blanco lechoso	Viscoso	7.69	104 000 00	69%	60%	42%	30%
Dominguillo	0,8 ml	blanco opaco	Viscoso	7.82	110 000 000	67%	45%	34%	42%
Promedio	1.76 ml	-	-	7.65	110 388 889.9	64.44%	42.22 %	34.44%	27.22%

ANEXO 2. Características seminales de alpacas del grupo Oxitocina.

MACHO	VOLUMEN	COLOR	ASPECTO	Ph	CONCENTRACION	VITALIDAD	MOTILIDAD	ENDOSMOSIS	ANORMALIDADES
ALTO 85	3 ml	blanco opaco	Viscoso	8.59	17 000 000	66%	30%	18%	20%
ALTO 85	0.8 ml	blanco lechoso	Semi viscoso	7.59	56 000 000	71%	32%	12%	30%
ALTO 85	2,0 ml	blanco opaco	Semi viscoso	7.64	51 000 000	70%	35%	15%	28%
CHIBOLO 84	1,2 ml	Blanco opaco	Viscoso	7.8	134 000 000	77%	37%	23%	29%
CHIBOLO 84	2 ml	blanco opaco	muy viscoso	8.43	14 000 000	46%	20%	36%	60%
CHIBOLO 84	0,7 ml	blanco opaco	Liquido	6.91	194 500 000	67%	25%	12%	35%
JORGE 72	2 ml	blanco cristalino	Semi viscoso	8.83	73 000 000	70%	21%	24%	30%
JORGE 72	4.5 ml	blanco opaco	Semi viscoso	8.42	109 000 000	54%	10%	5%	32%
JORGE 72	1,5 ml	blanco lechoso	Liquido	7.94	59 000 000	71%	50%	14%	33%
Promedio	1.96 ml	-	-	8.016	78 611 111.1	65.78%	25.89 %	17.67%	33.0%

ANEXO 3. Características seminales de alpacas del grupo GnRH + Oxitocina.

MACHO	VOLUMEN	COLOR	ASPECTO	Ph	CONCENTRACION	VITALIDAD	MOTILIDAD	ENDOSMOSIS	ANORMALIDADES
Rocky	0,8 ml	blanco cristalino	Liquido	8.32	1 500 000	62%	0%	5%	21%
Rocky	2,8 ml	blanco cristalino	Liquido	8.56	32 000 000	31%	5%	6%	29%
Rocky	0,5 ml	blanco cristalino	Liquido	8.47	3 000 000	33%	2%	3%	34%
Llorón	no dio semen	-	-	-	-	-	-	-	-
Llorón	no dio semen	-	-	-	-	-	-	-	-
Llorón	no dio semen	-	-	-	-	-	-	-	-
Mascara 134	no dio semen	-	-	-	-	-	-	-	-
Mascara 134	no dio semen	-	-	-	-	-	-	-	-
Mascara 134	0,2 ml	blanco cristalino	Liquido	7.52	10 000 000	22%	5%	7%	32%
Promedio	1.075 ml	-	-	8.22	11 625 000.0	37 %	3 %	5.25 %	29.0 %

ANEXO 4. Características seminales de alpacas del grupo control.

MACHO	VOLUMEN	COLOR	ASPECTO	pH	CONCENTRACION	VITALIDAD	MOTILIDAD	ENDOSMOSIS	ANORMALIDADES
VIEJO 83	1 ml	blanco opaco	Semi viscoso	8.14	79 000 000	79%	50%	13%	33%
VIEJO 83	0,5 ml	blanco lechoso	Semi viscoso	8.39	123 000 000	73%	50%	25%	29%
VIEJO 83	3,5 ml	blanco cristalino	liquido	8.13	18 500 000	73%	10%	10%	24%
LOCO 166	9 ml	blanco opaco	liquido	7.91	19 000 000	78%	30%	36%	27%
LOCO 166	1,5 ml	blanco opaco	Liquido	7.39	53 000 000	82%	28%	20%	25%
LOCO 166	2,3 ml	blanco opaco	Semi viscoso	8.39	85 000 000	63%	42%	37%	44%
CABALLO	3.2 ml	blanco opaco	Liquido	7.73	22 000 000	73%	45%	19%	14%
CABALLO	1,8 ml	blanco opaco	Semi viscoso	7.91	90 500 000	87%	75%	28%	16%
CABALLO	3,5 ml	blanco opaco	Semi viscoso	7.01	109 000 000	82%	50%	10%	24%
Promedio	2.92 ml	-	-	7.889	66 555 555.65	76.66 %	42.22	22.0 %	26.22 %

ANEXO 5. Concentraciones promedio de testosterona sérica (ng/ml) en los cuatro grupo de de estudio.

N° de muestreo	HORA	Control	GnRH	Oxitocina	GnRH+Oxit
1	0 min	1.9127	1.3752	5.73873333	2.3412
2	15 min	1.82893333	4.0909	4.2277	2.2302
3	30 min	1.43346667	4.62245	6.5451	4.4379
4	45 min	1.39933333	6.38803333	7.32576667	4.57163333
5	60 min	1.12593333	15.2745	2.726	5.02093333
6	75 min	1.01306667	7.7589	4.02756667	5.2488
7	90 min	0.61146667	6.70803333	3.1627	3.9817
8	105 min	0.808	6.75826667	2.49983333	11.0150667
9	120 min	0.5874	6.03786667	2.8145	2.91363333
10	135 min	1.03926667	6.23296667	1.8348	3.37866667

ANEXO 6. ESTANDARIZACION DE DATOS A VALORES RADICALES, VALORES LOGARITMICOS Y VALORES ANGULARES.

The SAS System

GUR	VO	OL	UR	CON	CON	VIT	MO	END	ANO					
OU	OL	UR	PH	ON	OG	TA	IT	NO	OR					
bs	U	Z	H	C	G	A	G	S	G					
1	CONTROL	1.0	1.41	8.14	79000000	7.90	79	62.73	50	45.00	13	21.13	33	35.06
2	CONTROL	0.5	1.22	8.39	123000000	8.09	73	58.69	50	45.00	25	30.00	29	32.58
3	CONTROL	3.5	2.12	8.13	18000000	7.26	73	58.69	10	18.43	10	18.43	24	29.33
4	CONTROL	9.0	3.16	7.91	19000000	7.28	78	62.03	30	33.21	36	36.87	27	31.31
5	CONTROL	1.5	1.58	7.39	53000000	7.72	82	64.90	28	31.95	20	26.57	25	30.00
6	CONTROL	2.3	1.82	8.39	85000000	7.93	63	52.54	42	40.40	37	37.46	44	41.55
7	CONTROL	3.2	2.05	7.73	22000000	7.34	73	58.69	45	42.13	19	25.84	14	21.97
8	CONTROL	1.8	1.67	7.91	90000000	7.95	87	68.87	75	60.00	28	31.95	16	23.58
9	CONTROL	3.5	2.12	7.01	109000000	8.04	82	64.90	50	45.00	10	18.43	24	29.33
10	OXITOCIN	3.0	2.00	8.59	17000000	7.23	66	54.33	30	33.21	18	25.10	20	26.57
11	OXITOCIN	0.8	1.34	7.59	56000000	7.75	71	57.42	32	34.45	12	20.27	30	33.21
12	OXITOCIN	2.0	1.73	7.64	51000000	7.71	70	56.79	35	36.27	15	22.79	28	31.95
13	OXITOCIN	1.2	1.48	7.80	134000000	8.13	77	61.34	37	37.46	23	28.66	29	32.58
14	OXITOCIN	2.0	1.73	8.43	14000000	7.15	46	42.71	20	26.57	36	36.87	60	50.77
15	OXITOCIN	0.7	1.30	6.91	194000000	8.29	67	54.94	25	30.00	12	20.27	35	36.27
16	OXITOCIN	2.0	1.73	8.83	73000000	7.86	70	56.79	21	27.27	24	29.33	30	33.21
17	OXITOCIN	4.5	2.35	8.42	109000000	8.04	54	47.29	10	18.43	5	12.92	32	34.45
18	OXITOCIN	1.5	1.58	7.94	59000000	7.77	71	57.42	50	45.00	14	21.97	33	35.06
19	GNRHoxIT	0.8	1.34	8.32	1500000	6.18	62	51.94	0	0.00	5	12.92	21	27.27
20	GNRHoxIT	2.8	1.95	8.56	32000000	7.51	31	33.83	5	12.92	6	14.18	29	32.58
21	GNRHoxIT	0.5	1.22	8.47	3000000	6.48	33	35.06	2	8.13	3	9.97	34	35.67
22	GNRHoxIT	0.2	1.10	7.52	10000000	7.00	22	27.97	5	12.92	7	15.34	32	34.45
23	GNRH	3.5	2.12	8.33	42000000	7.62	77	61.34	45	42.13	32	34.45	31	33.83
24	GNRH	0.5	1.22	8.00	75000000	7.88	36	36.87	22	27.97	34	35.67	41	39.82
25	GNRH	4.0	2.24	7.49	101000000	8.00	52	46.15	55	47.87	36	36.87	15	22.79
26	GNRH	2.0	1.73	6.95	227000000	8.36	78	62.03	50	45.00	27	31.31	18	25.10
27	GNRH	1.0	1.41	8.10	91000000	7.96	88	69.73	45	42.13	25	30.00	20	26.57
28	GNRH	3.0	2.00	7.31	215000000	8.33	47	43.28	60	50.77	47	43.28	21	27.27
29	GNRH	0.7	1.30	7.22	28000000	7.45	66	54.33	25	30.00	33	35.06	27	31.31
30	GNRH	0.4	1.18	7.69	104000000	8.02	69	56.17	60	50.77	42	40.40	30	33.21
31	GNRH	0.8	1.34	7.82	110000000	8.04	67	54.94	45	42.13	34	35.67	42	40.40

ANEXO 7. ANVA Y DUNCAN PARA VOLUMEN DE SEMEN (SAS)

Dependent Variable: VOLURAIZ

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.79805475	0.26601825	1.37	0.2725
Error	27	5.23571944	0.19391553		
Corrected Total	30	6.03377419			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	VOLURAIZ Mean		
0.132265	25.98232	0.440358	1.694839		

Analysis Variable : VOLU

		N		Coeff of			
GRUPO	Obs	N	Mean	Std Dev	Variation	Minimum	Maximum
CONTROL	9	9	2.9222222	2.5227851	86.3310476	0.5000000	9.0000000
GNRH	9	9	1.7666667	1.4008926	79.2958060	0.4000000	4.0000000
GNRHOXIT	4	4	1.0750000	1.1757976	109.3765211	0.2000000	2.8000000
OXITOCIN	9	9	1.9666667	1.1863811	60.3244603	0.7000000	4.5000000

Duncan's Multiple Range Test for VOLURAIZ

Alpha 0.05

g	Mean	N	GRUPO
A	1.9056	9	CONTROL
A	1.6933	9	OXITOCIN
A	1.6156	9	GNRH
A	1.4025	4	GNRHOXIT

ANEXO 8.- ANVA Y DUNCAN PARA pH (SAS)

Dependent Variable: PH

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	1.05970708	0.35323569	1.38	0.2699
Error	27	6.90776389	0.25584311		
Corrected Total	30	7.96747097			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	PH Mean		
0.133004	6.401866	0.505809	7.900968		

Analysis Variable : PH

		Coeff of					
GRUPO	Obs	N	Mean	Std Dev	Variation	Minimum	Maximum
CONTROL	9	9	7.8888889	0.4570133	5.7931257	7.0100000	8.3900000
GNRH	9	9	7.6566667	0.4518849	5.9018495	6.9500000	8.3300000
GNRHOXIT	4	4	8.2175000	0.4754209	5.7854684	7.5200000	8.5600000
OXITOCIN	9	9	8.0166667	0.6046900	7.5429106	6.9100000	8.8300000

Duncan's Multiple Range Test for PH

Alpha 0.05

g	Mean	N	GRUPO
A	8.2175	4	GNRHOXIT
A	8.0167	9	OXITOCIN
A	7.8889	9	CONTROL
A	7.6567	9	GNRH

ANEXO 9. ANVA Y DUNCAN PARA CONCENTRACION ESPERMATICA (SAS)

Dependent Variable: CONCLOG

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	3.95610493	1.31870164	9.37	0.0002
Error	27	3.80043056	0.14075669		
Corrected Total	30	7.75653548			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	CONCLOG Mean		
0.510035	4.881203	0.375176	7.686129		

Analysis Variable : CONC

GRUPO	N		Mean	Std Dev	Coeff of		
	Obs	N			Variation	Minimum	Maximum
CONTROL	9	9	66444444.44	40031584.75	60.2482045	18000000.00	123000000
GNRH	9	9	110333333	68705894.94	62.2712039	28000000.00	227000000
GNRHOXIT	4	4	11625000.00	14079388.01	121.1130151	1500000.00	32000000.00
OXITOCIN	9	9	78555555.56	58058399.72	73.9074395	14000000.00	194000000

Duncan's Multiple Range Test for CONCLOG

Alpha		0.05		
g	Mean	N	GRUPO	
A	7.9622	9	GNRH	
A	7.7700	9	OXITOCIN	
A	7.7233	9	CONTROL	
B	6.7925	4	GNRHOXIT	

ANEXO 10. ANVA Y SCHEEFE PARA VITALIDAD ESPERMATICA (SAS)

Dependent Variable: VITAANG

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	1614.700194	538.233398	9.04	0.0003
Error	27	1607.977044	59.554705		
Corrected Total	30	3222.677239			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	VITAANG Mean		
0.501043	14.28500	7.717170	54.02290		

Analysis Variable : VITA

		N		Coeff of			
GRUPO	Obs	N	Mean	Std Dev	Variation	Minimum	Maximum
CONTROL	9	9	76.6666667	7.0533680	9.2000452	63.0000000	87.0000000
GNRH	9	9	64.4444444	16.5613338	25.6986214	36.0000000	88.0000000
GNRHOXIT	4	4	37.0000000	17.3397424	46.8641687	22.0000000	62.0000000
OXITOCIN	9	9	65.7777778	9.6666667	14.6959459	46.0000000	77.0000000

Scheffe's Test for VITAANG

Alpha 0.05

g	Mean	N	GRUPO
A	61.338	9	CONTROL
A	54.337	9	OXITOCIN
A	53.871	9	GNRH
B	37.200	4	GNRHOXIT

ANEXO 11. ANVA Y SCHEEFE PARA MOTILIDAD ESPERMATICA (SAS)

Dependent Variable: MOTIANG

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	3559.562255	1186.520752	14.76	<.0001
Error	27	2169.762319	80.361567		
Corrected Total	30	5729.324574			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	MOTIANG Mean		
0.621288	26.15464	8.964461	34.27484		

Analysis Variable : MOTI

N		Coeff of					
GRUPO	Obs	N	Mean	Std Dev	Variation	Minimum	Maximum
CONTROL	9	9	42.2222222	18.2124805	43.1348221	10.0000000	75.0000000
GNRH	9	9	45.2222222	13.7092831	30.3153681	22.0000000	60.0000000
GNRHOXIT	4	4	3.0000000	2.4494897	81.6496581	0	5.0000000
OXITOCIN	9	9	28.8888889	11.5806352	40.0868141	10.0000000	50.0000000

Scheffe's Test for MOTIANG

Alpha 0.05

g	Mean	N	GRUPO
A	42.086	9	GNRH
A	40.124	9	CONTROL
A	32.073	9	OXITOCIN
B	8.493	4	GNRHOXIT

ANEXO 12. ANVA Y SCHEEFE PARA ENDOSMOSIS (SAS)

Dependent Variable: ENDOSANG

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	1548.193216	516.064405	14.75	<.0001
Error	27	944.767719	34.991397		
Corrected Total	30	2492.960935			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	ENDOSANG Mean		
0.621026	21.83099	5.915353	27.09613		

Analysis Variable : ENDOS

GRUPO	N		Coeff of				
	Obs	N	Mean	Std Dev	Variation	Minimum	Maximum
CONTROL	9	9	22.0000000	10.2956301	46.7983188	10.0000000	37.0000000
GNRH	9	9	34.4444444	6.8027772	19.7499984	25.0000000	47.0000000
GNRHOXIT	4	4	5.2500000	1.7078251	32.5300024	3.0000000	7.0000000
OXITOCIN	9	9	17.6666667	9.0138782	51.0219520	5.0000000	36.0000000

Scheffe's Test for ENDOSANG

Alpha 0.05

	Mean	N	GRUPO
A	35.857	9	GNRH
B	27.409	9	CONTROL
B	24.242	9	OXITOCIN
C	13.103	4	GNRHOXIT

ANEXO 13. ANVA Y SCHEEFE PARA ANORMALIDADES ESPERMATICAS (SAS)

Dependent Variable: ANORANG

		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	101.095696	33.698565	0.94	0.4362
Error	27	970.572697	35.947137		
Corrected Total	30	1071.668394			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	ANORANG Mean		
0.094335	18.60401	5.995593	32.22742		

Analysis Variable : ANOR

GRUPO	N		Mean	Std Dev	Coeff of		
	Obs	N			Variation	Minimum	Maximum
CONTROL	9	9	26.2222222	8.9131613	33.9908694	14.0000000	44.0000000
GNRH	9	9	27.2222222	9.7182532	35.6997055	15.0000000	42.0000000
GNRHOXIT	4	4	29.0000000	5.7154761	19.7085382	21.0000000	34.0000000
OXITOCIN	9	9	33.0000000	10.9658561	33.2298670	20.0000000	60.0000000

Scheffe's Test for ANORANG

Alpha 0.05

g	Mean	N	GRUPO
A	34.897	9	OXITOCIN
A	32.493	4	GNRHOXIT
A	31.144	9	GNRH
A	30.523	9	CONTROL

ANEXO 14. CHI CUADRADO PARA COLOR (SAS).

Table of GRUPO by COLOR

GRUPO COLOR

Tabla de contingencia

			COLOR			Total
			blanco cristalino	Blanco lechoso	Blanco opaco	
GRUPO CONTROL	Recuento	1	1	7	9	
	% de GRUPO	11.1%	11.1%	77.8%	100.0%	
GRRH	Recuento	0	2	7	9	
	% de GRUPO	.0%	22.2%	77.8%	100.0%	
GRRHOXITOC	Recuento	4	0	0	4	
	% de GRUPO	100.0%	.0%	.0%	100.0%	
OXITOCINA	Recuento	1	2	6	9	
	% de GRUPO	11.1%	22.2%	66.7%	100.0%	
Total	Recuento	6	5	20	31	
	% de GRUPO	19.4%	16.1%	64.5%	100.0%	

Statistics for Table of GRUPO by COLOR

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	6	313.1964	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Square	6	358.0241	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	27.8302	<.0001
Phi Coefficient		0.8849	
Contingency Coefficient		0.6627	
Cramer's V		0.6257	

ANEXO 15. CHI CUADRADO PARA ASPECTO (SAS).

Table of GRUPO by COLOR

GRUPO COLOR

Tabla de contingencia

			ASPECTO				Total
			LIQUIDO	muy viscoso	SEMIVISCOSO	Viscoso	
GRUPO	CONTROL	Recuento	4	0	5	0	9
		% de GRUPO	44.4%	.0%	55.6%	.0%	100.0%
	GNRH	Recuento	1	0	4	4	9
		% de GRUPO	11.1%	.0%	44.4%	44.4%	100.0%
	GNRHOXITOC	Recuento	4	0	0	0	4
		% de GRUPO	100.0%	.0%	.0%	.0%	100.0%
	OXITOCINA	Recuento	2	1	4	2	9
		% de GRUPO	22.2%	11.1%	44.4%	22.2%	100.0%
Total		Recuento	11	1	13	6	31
		% de GRUPO	35.5%	3.2%	41.9%	19.4%	100.0%

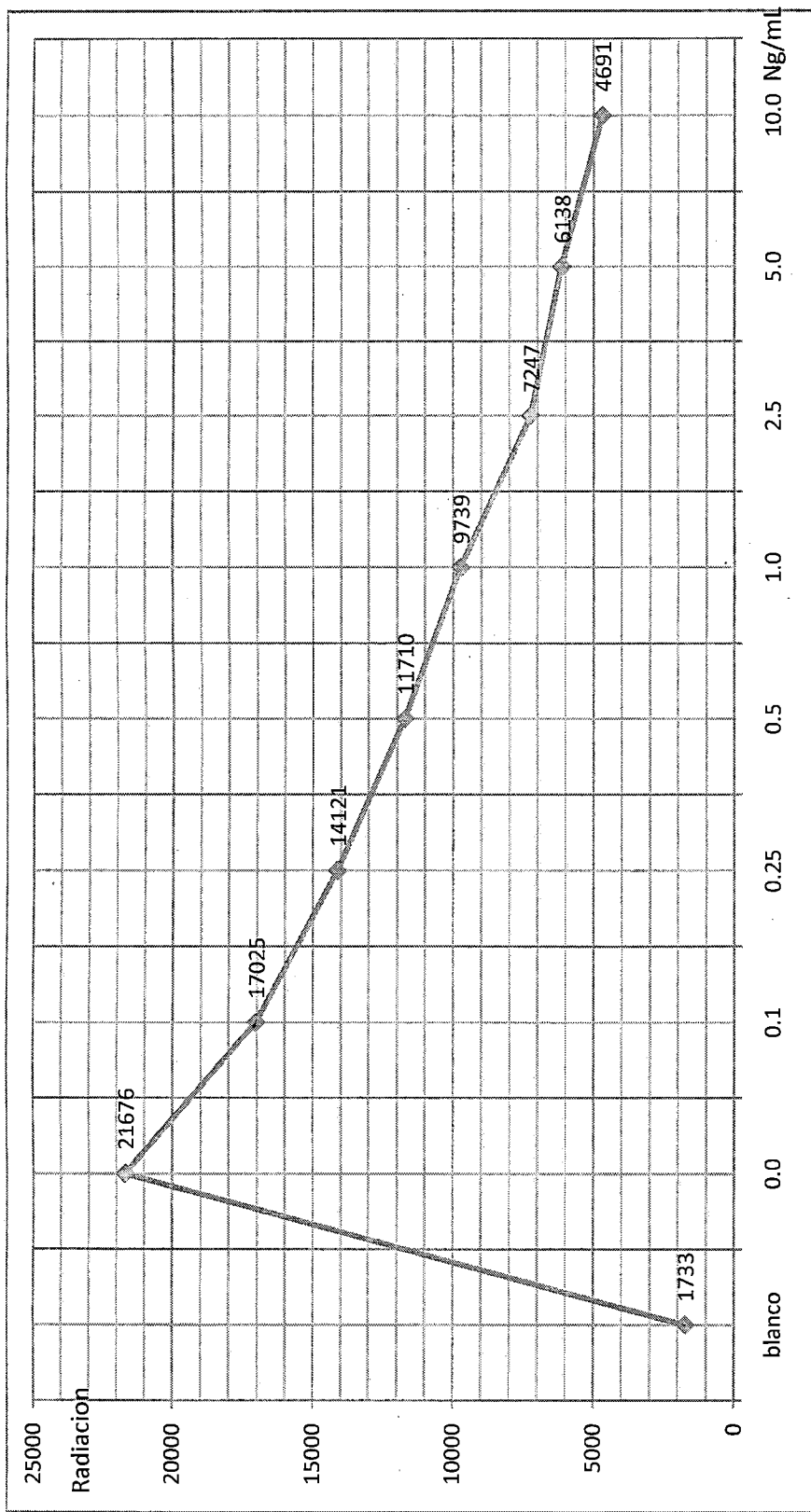
Statistics for Table of GRUPO by COLOR

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	9	270.7709	<.0001
Likelihood Ratio Chi-Square	9	316.0609	<.0001
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	1.1042	0.2933
Phi Coefficient		0.8230	
Contingency Coefficient		0.6354	
Cramer's V		0.4751	

ANEXO 16. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LA PRUEBA RIA, UTILIZANDO TUBOS BLANCO, ESTÁNDAR, MUESTRAS DE SUERO CONGELADO DE ALPACA, SUERO FRESCO DE ALPACA Y SUERO FRESCO DE HUMANO.

1° CURVA DE CALIBRACION			2° CURVA DE CALIBRACION		
TUBO	CONTENIDO	LECTURA	TUBO	CONTENIDO	LECTURA
1	blanco	684	1	blanco	1733
2	0.0	21667	2	0.0	21676
3	0.1	17701	3	0.1	17025
4	0.25	15264	4	0.25	14121
5	0.5	12364	5	0.5	11710
6	1.0	10458	6	1.0	9739
7	2.5	7643	7	2.5	7247
8	5.0	5723	8	5.0	6138
9	10.0	4430	9	10.0	4691
10	muestra 29	10573			
11	muestra39	12532			
12	muestra 16-0	11546			
13	muestra 16-30	9307			
14	humano 1	6297			
15	humano 2	5042			
16	macho entero 1	7106			
17	macho entero 2	6933			
18	castrado	3891			

ANEXO 17. GRAFICO DE CURVA DE CALIBRACION.



ANEXO 18. LECTURAS DE TESTOSTERONA POR RIA PARA EL GRUPO CONTROL

ALPACA 1				ALPACA 2				ALPACA 3				Prom
HORA	Tº	LEC	T4	HORA	Tº	LEC	T4	HORA	Tº	LEC	T4	
0 min	19	6124	4.4043	0	29	10293	0.9097	0	39	12644	0.4241	1.9127
15 min	20	6477	3.7476	15 min	30	9022	1.3973	15 min	40	13300	0.3419	1.82893
30 min	21	7562	2.3875	30 min	31	9410	1.2225	30 min	41	11138	0.6904	1.43346
45 min	22	7365	2.5803	45 min	32	9126	1.3478	45 min	42	14004	0.2699	1.399333
60 min	23	8054	1.9791	60 min	33	9499	1.1861	60 min	43	14691	0.2126	1.125933
75 min	24	8306	1.8034	75 min	34	10220	0.9319	75 min	44	13653	0.3039	1.013066
90 min	25	9281	1.2777	90 min	35	13784	0.2908	90 min	45	14048	0.2659	0.611466
105 min	26	9118	1.3515	105 min	36	11119	0.6947	105 min	46	12997	0.3778	0.808
120 min	27	10932	0.7382	120 min	37	11096	0.6999	120 min	47	13461	0.3241	0.5874
135 min	28	10713	0.7927	135 min	38	10039	0.9894	135 min	48	9152	1.3357	1.039266

Tº: Número de tubo

LEC: Lectura de radiación

PROMEDIOS PARA TESTOSTERONA GRUPO CONTROL

T4: Testosterona en ng

Prom: Promedio

HORA	Promedio
0	1.9127
15 min	1.82893333
30 min	1.43346667
45 min	1.39933333
60 min	1.12593333
75 min	1.01306667
90 min	0.61146667
105 min	0.808
120 min	0.5874
135 min	1.03926667

ANEXO 19. LECTURAS DE TESTOSTERONA POR RIA PARA EL GRUPO GnRH

ALPACA 1				ALPACA 2				ALPACA 3			
HORA	nº de TUBO	LECTURA	Testosterona1	HORA	nº DE TUBO	LECTURA	Testosterona2	HORA	nº DE TUBO	LECTURA	Testosterona3
0	49	perdido		0	59	perdido		0	69	9068	1.3752
15 min	50	perdido		15 min	60	perdido		15 min	70	6283	4.0909
30 min	51	5903	4.8961	30 min	61	perdido		30 min	71	6151	4.3488
45 min	52	5569	5.7927	45 min	62	5372	6.4305	45 min	72	5233	6.9409
60 min	53	5040	7.7488	60 min	63	3460	25.524	60 min	73	4294	12.5507
75 min	54	6106	4.4418	75 min	64	4589	10.2439	75 min	74	4867	8.591
90 min	55	5920	4.8557	90 min	65	5984	4.7076	90 min	75	4543	10.5608
105 min	56	5297	6.6991	105 min	66	5409	6.3035	105 min	76	5149	7.2722
120 min	57	5719	5.3643	120 min	67	4427	11.426	120 min	77	9179	1.3233
135 min	58	5538	5.8871	135 min	68	4950	8.1715	135 min	78	6014	4.6403

PROMEDIOS DE TESTOSTERONA PARA GRUPO GnRH

HORA	Promedio
0	1.3752
15 min	4.0909
30 min	4.62245
45 min	6.38803333
60 min	15.2745
75 min	7.7589
90 min	6.70803333
105 min	6.75826667
120 min	6.03786667
135 min	6.23296667

ANEXO 20.- LECTURAS DE TEST OSTERONA POR RIA PARA EL GRUPO OXITOCINA

ALPACA 1				ALPACA 2				ALPACA 3			
HORA	TUBO	LECTURA	Testosterona	HORA	TUBO	LECTURA	Testosterona	HORA	TUBO	LECTURA	Testosterona
0	79	15202	0.1767	0	89	4297	12.5236	0	99	6071	4.5159
15 min	80	13945	0.2754	15 min	90	4932	8.26	15 min	100	6253	4.1477
30 min	81	5577	5.7687	30 min	91	4324	12.2833	30 min	101	8667	1.5833
45 min	82	6163	4.3245	45 min	92	3962	16.1802	45 min	102	8872	1.4726
60 min	83	8311	1.8001	60 min	93	5817	5.1077	60 min	103	9298	1.2702
75 min	84	6019	4.6292	75 min	94	5428	6.2397	75 min	104	9431	1.2138
90 min	85	5964	4.7532	90 min	95	6449	3.7947	90 min	105	10193	0.9402
105 min	86	6387	3.9019	105 min	96	7044	2.9392	105 min	106	11285	0.6584
120 min	87	9361	1.2431	120 min	97	6432	3.8237	120 min	107	6715	3.3767
135 min	88	7637	2.3189	135 min	98	8054	1.9791	135 min	108	9449	1.2064

PROMEDIOS DE TESTOSTERONA PARA EL GRUPO OXITOCINA

HORA	Promedio
0	5.73873333
15 min	4.2277
30 min	6.5451
45 min	7.32576667
60 min	2.726
75 min	4.02756667
90 min	3.1627
105 min	2.49983333
120 min	2.8145
135 min	1.8348

ANEXO 21.- LECTURAS DE TESTOSTERONA POR RIA PARA EL GRUPO DE OXITOXINA + GnRH

ALPACA 1				ALPACA 2				ALPACA 3			
HORA	TUBO	LECTURA	Testosterona	HORA	TUBO	LECTURA	Testosterona	HORA	TUBO	LECTURA	Testosterona
0	109	9304	1.2676	0	119	2650	perdido	0	129	6689	3.4148
15 min	110	8181	1.8881	15 min	120	6913	3.104	15 min	130	8471	1.6985
30 min	111	6837	3.2051	30 min	121	6285	4.0871	30 min	131	5495	6.0215
45 min	112	6273	4.1097	45 min	122	5662	5.5218	45 min	132	6287	4.0834
60 min	113	5841	5.0474	60 min	123	6364	3.9427	60 min	133	5479	6.0727
75 min	114	5808	5.1306	75 min	124	5738	5.3132	75 min	134	5742	5.3026
90 min	115	6719	3.3709	90 min	125	6552	3.6251	90 min	135	5881	4.9491
105 min	116	6080	4.4967	105 min	126	3520	24.0304	105 min	136	6070	4.5181
120 min	117	7510	2.4366	120 min	127	7255	2.6967	120 min	137	6563	3.6076
135 min	118	6766	3.3035	135 min	128	8285	1.8173	135 min	138	5854	5.0152

PROMEDIOS DE TESTOSTERONA PARA EL GRUPO OXITOCINA + GnRH

HORA	Promedio
0	2.3412
15 min	2.2302
30 min	4.4379
45 min	4.57163333
60 min	5.02093333
75 min	5.2488
90 min	3.9817
105 min	11.0150667
120 min	2.91363333
135 min	3.37866667

ANEXO 22.- ANALISIS ESTADISTICO DE LAS CONCENTRACIONES DE TESTOSTERONA SERICA.

ANVA				
FV	GL	SC	CM	Fc
Tratamientos	3	145.985	48.6615474	8.12689102
Bloques	9	43.177	4.7973898	0.80120477
Error	27	161.668	5.98771994	
TOTAL	39	350.830		

Prueba de Duncan o Duncan test			
GnRH	Oxc+GnRH	Oxitocina	Control
a	ab		
		b	
			c

ANEXO 23.- TAMAÑOS TESTICULARES Y PESOS VIVOS DE LOS MACHOS UTILIZADOS EN COLECCIÓN SEMINAL

Arete	Collar	Nombre	Evaluación testicular (cm)						Peso vivo (Kg)
			Derecho			Izquierdo			
			Largo	Ancho	Consist.	Largo	Ancho	Consist.	
134105	s/c	Chibolo	3.3	1.8	B	3.7	2.2	B	71
063103	72	Jorge	4.6	2.5	R	4	2.4	R	66.5
2006	158	Dominguillo	4	2.1	B	4.1	2.1	B	68
1006	80	Rocky	4.7	2.5	R	4.9	2.5	R	59.5
13145	166	Loco	3.8	2.2	B	3.8	2.2	B	64
153298	s/c	Caballo	5.2	3	B	5.2	3	B	80
1806	85	Alto	4.3	2.6	B	4.5	2.5	B	82
000380	83	Viejo	4.6	2.1	B	4.2	2.6	B	74.5
1199	s/c	Llorón	4.6	2.2	B	4	2	B	59.5
CONACS01	s/c	Mascara	4	1.3	R	3.7	2	B	54
			4.31	2.23		4.21	2.35		67.9
B: Bueno									
R: Regular									

ANEXO 24. PREPARACION DE REACTIVOS

1. SOLUCION HIPOOSMOTICA:

0.735 g de Citrato de sodio

1.351 g de D-fructosa

En 100 ml de agua bidestilada desmineralizada desionizada

WHO, 2010. WHO laboratory manual for the Examination and processing of Human Semen. Fifth Edition. World Health Organization 2010.

2 . EOSINA + NIGROSINA (TINCION SUPRAVITAL)

6.7 g/L de Eosina Y

100 g/L de Nigrosina

En agua bidestilada.

Bjorndhal, L; Soderlund I; Johansson, S; Mohammadie, M; Pourian M.R and Kvist, U. Why the WHO recommendations of eosin.nigrosin stainingTechnichs in human sperm vitality assessment must change. J of Androl, n° 25, Vol 5. 2004.

3. PBS (Phosphate buffer saline, D'ulbeccos)

9.6 g/ L de agua bidestilada desionizada y desmineralizada

Sigma ®