

016724
204



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
División de Estudios de Posgrado



**EFFECTO DEL METODO DE COLECTA SOBRE LAS
CARACTERISTICAS DE SEMEN EN GANADO
CEBU Y EUROPEO BAJO CONDICIONES
TROPICALES.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL

(Rep. An.)

P r e s e n t a :

HORACIO LEON VELASCO

Asesores: Dr. Carlos Galina H.
Dr. Antonio Porras A.
Dr. Ricardo Navarro Fierro

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LISTA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
II REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Colección de semen.....	3
2.2 Características del semen.....	5
2.2.1 Volumen.....	5
2.2.2 pH.....	7
2.2.3 Concentración.....	8
2.2.4 Movilidad.....	12
2.2.4.1 Evaluación de la movilidad en semen fresco. ...	13
2.2.4.2 Evaluación de la movilidad del semen descongelado	16
2.2.5. Anormalidades.....	19
III. MATERIAL Y METODOS.....	22
3.1 Localización del área de estudio	22
3.2 Animales.....	22
3.3 Experimento 1.....	23
3.4 Experimento 2.....	23
3.5 Evaluación del semen.....	24
3.6 Dilución y congelamiento del semen.....	26
3.7 Análisis estadístico.....	28
IV RESULTADOS.....	30
4.1 Resultados del experimento 1.....	30
4.2 Resultados del experimento 2.....	36
V. DISCUSION.....	42
VI. LITERATURA CITADA.....	50

LISTA DE CUADROS

<u>CUADRO</u>	<u>Página</u>
1. Promedio de las características seminales de los toros colectados alternativamente por vagina artificial y electroeyaculación.....	32
2. Promedio de movilidad espermática de los sementales colectados alternativamente por vagina artificial y electroeyaculación.....	32
3. Cuadrados medios de los análisis de varianza de cada una de las características del semen colectado tanto por electroeyaculación como por vagina artificial.....	33
4. Correlaciones entre las características seminales en estudio (experimento 1).....	35
5. Promedio de las características seminales de los toros colectados por un solo método:electroeyaculación o vagina artificial.....	38
6. Promedio de la movilidad espermática en los sementales colectados solamente por un método:vagina artificial o electroeyaculación.....	38
7. Cuadrados medios de los análisis de varianza de las características seminales de los toros colectados por un sólo método:electroeyaculación o vagina artificial.....	39
8. Coeficientes de correlación para las variables del experimento 2.....	41

RESUMEN.

LEON VELASCO HORACIO. Efecto del método de colecta sobre las características del semen en ganado cebú y europeo bajo condiciones tropicales (Bajo la dirección del Dr. CARLOS GALINA HIDALGO).

Con el objeto de valorar el efecto del método de colección del semen, electroeyaculación y vagina artificial sobre las características macroscópicas, microscópicas y el porcentaje de recuperación de células espermáticas en el semen descongelado del ganado Bos indicus y Bos taurus bajo condiciones del trópico, se utilizaron 60 sementales (30 Bos indicus y 30 Bos taurus) en los que se llevaron a cabo dos experimentos. En el primer experimento se utilizaron 20 sementales (10 Bos indicus y 10 Bos taurus), los cuales fueron colectados tanto por el sistema de electroeyaculación como por medio de vagina artificial, éste último efectuándose en ambas especies con una vaca en estro. El intervalo de colectas por diferentes métodos fue de 3 a 4 días. En el segundo experimento se formó por 20 toros Bos indicus y 20 sementales del ganado tipo Bos taurus, los cuales a su vez se subdividieron en 4 subgrupos de 10 animales del mismo genotipo respectivamente. Los primeros 10 toros cebuinos fueron colectados por vagina artificial y los 10 sementales restantes de ésta misma especie por el sistema de electroeyaculación. Asimismo, se empleó este procedimiento para los animales europeos. Estos animales se trabajaron exclusivamente por un método de colección de semen

electroeyaculación o vagina artificial. En ambos experimentos se tomó el primero, segundo y tercero eyaculados para cada sistema de colección tan pronto como fue posible entre eyaculados (5-30 minutos).

Para determinar el efecto del método de colecta sobre la recuperación espermática del semen descongelado se congelaron 50 pajillas francesas de 0.5 ml en cada colecta de semen con una concentración seminal de 30 millones de espermatozoides móviles por dosis.

En ambos experimentos se observó que el método de colección ejerce un efecto significativo para el volumen del eyaculado, pH y concentración seminal, ya que los animales trabajados por electroeyaculación presentaron valores superiores para el volumen y el pH del semen. En contraste, la concentración espermática fue mayor en el ganado colectado por medio de vagina artificial al obtenido por electroeyaculación.

Con respecto a la movilidad en masa e individual en los dos ensayos no se vió efecto significativo por el sistema de colección. Sin embargo, la especie sí influyó en la movilidad individual en los animales del experimento 1.

Los resultados en ambos experimentos indicaron que el método de extracción de semen ejerce una influencia significativa sobre la recuperación espermática del semen descongelado, sin importar el tipo racial de donde se obtuvo el eyaculado.

I. INTRODUCCION

Las limitantes del conocimiento de muchas de las características de la fisiología reproductiva de los bovinos en áreas tropicales son ampliamente discutidas por Orihuela (1982). En resumen, frecuentemente se extrapola la información obtenida en ganado europeo explotado en el altiplano hacia el ganado asiático desarrollado en el clima tropical, sin considerar que son especies diferentes y probablemente no responden de la misma manera en condiciones similares. Actualmente, las investigaciones realizadas sobre el comportamiento reproductivo del macho bajo las condiciones tropicales alcanzan solamente un 20% del total de los trabajos realizados sobre eficiencia reproductiva de los bovinos en esas áreas geográficas (Galina y Russell, 1987), por lo cual es necesario incrementar el conocimiento en esta área para poder evaluar la capacidad reproductiva de los machos en el trópico.

En los últimos años en México se ha realizado investigación aplicada sobre la evaluación de semen, donde algunos autores han observado que la movilidad promedio del semen descongelado en el ganado Bos indicus es alrededor de un 30% (Barwise et al. 1984), comparado con resultados en Bos taurus, donde se ha encontrado que la movilidad promedio después del descongelado puede ser de hasta un 50% (Pickett et al. 1976). La pobre recuperación espermática de las dosis del semen congelado del ganado Bos indicus son corroborados en un estudio comparativo por Rhodes et al. (1985), quienes

observaron que el semen de éste tipo de ganado tiene una recuperación después del descongelado menor a la del semen proveniente del ganado tipo Bos taurus utilizado en el trópico mexicano. En este mismo trabajo los autores especulan la posibilidad de que la diferencia en el porcentaje de recuperación de los espermatozoides después del descongelado pueda ser debido al método de colección, ya que el semen de Bos indicus generalmente se colecta por electroeyaculación y el de Bos taurus por vagina artificial. Esto podría deberse a que el semen colectado por electroeyaculación normalmente incrementa el pH, lo cual reduce ligeramente la movilidad espermática (Austin et al. 1961)

OBJETIVOS.

El objetivo fue evaluar el efecto del método de colección de semen electroeyaculación y vagina artificial sobre las características macroscópicas y microscópicas y el porcentaje de recuperación de células espermáticas en el semen descongelado en el ganado tipo Bos indicus y Bos taurus.

II REVISION DE LITERATURA.

2.1 Colección de semen.

Uno de los renglones más importantes en el proceso previo a la congelación del semen lo constituye el uso adecuado de las técnicas para la colección del mismo, las cuales van a regir en gran parte la cantidad y calidad y por ende una eficaz utilización de los sementales (Hernández et al. 1976).

Existen diversos métodos para realizar la colección del semen, pero los más utilizados en la práctica diaria en el ganado bovino son la vagina artificial y el electroeyaculador. Estos sirven para evaluar la producción espermática y la actividad fisiológica del aparato reproductor del semental (Austin et al. 1961; Calderón, 1983; Randall, 1986). El procedimiento más adecuado parece ser el colectar el semen por el método de vagina artificial, ya que permite simultáneamente otras evaluaciones cómo son: la libido, problemas de apoyo, observaciones del pene erecto y su mucosa (Chenoweth, 1986; Berndtson y Igboeli, 1988).

El electroeyaculador se utiliza cuando el semental rehusa la vagina artificial o cuando el animal no está entrenado para ser colectado por éste método; sin embargo, también es utilizado cuando existen problemas por la avanzada edad o cuando poseen lesiones en los miembros posteriores y columna vertebral que le impidan realizar la monta (Austin et al. 1961; Chenoweth y Osborne 1978). Muchos estudios demuestran que el uso del electroeyaculador para colectar el

semen es independiente de la libido del animal y de su capacidad para la monta, siendo más utilizado en sementales productores de carne debido al temperamento y manejo de estos animales (Chenoweth y Osborne, 1975; Chenoweth y Osborne, 1978). Con este método la eyaculación ocurre entre un 95 a 98% de los casos, aunque algunos toros pueden eyacular sin la erección del pene y depositar el semen en la bolsa del prepucio (Hill et al. 1956; Furman et al. 1975, Lunstra y Echternkamp, 1982).

El semen colectado mediante vagina artificial es diferente al obtenido con el electroeyaculador, ya que al utilizar este último las muestras son más diluidas debido a que los fluidos de las glándulas accesorias le dan mayor volumen, un alto pH y una menor concentración espermática en el eyaculado (Calderón, 1983; Clarke et al. 1973; Flores et al. 1984). Algunos autores consideran que no hay diferencias en el porcentaje de espermatozoides móviles y la fertilidad del semen entre los eyaculados obtenidos mediante ambos métodos (Austin et al. 1961; Clarke et al. 1973; Singleton, 1970). Sin embargo, éstos estudios no fueron realizados con semen congelado sino mediante evaluaciones de semen refrigerado a 5 °C por cuatro días.

2.2 Características del semen.

2.2.1 Volumen.

El volumen del eyaculado del toro puede variar entre 2 y 15 ml dependiendo de la edad, la raza, el método de colecta, individualidad de los toros, época del año y el grado de estímulo sexual previo a la colección. El volumen no está relacionado con la capacidad fertilizante, pues animales estériles pueden producir eyaculaciones voluminosas (Herrera, 1978; Igboeli y Rakha 1971; Menendez et al. 1984).

Menendez et al. (1979) al congelar semen de ganado cebú bajo las condiciones de Cuba encontraron que la edad resultó ser la principal causa de variación sobre el volumen del semen, aumentando significativamente ($P < 0.01$) hasta los 54 - 60 meses de edad, a partir de donde se mantiene estable. Otros autores también han encontrado que la edad de los sementales es un factor determinante del volumen del eyaculado (Menendez et al. 1984, Raja y Rao. 1983). Por otra parte, el efecto del método de colecta sobre el volumen del semen ha sido ampliamente demostrado por varios investigadores, ya que generalmente el semen colectado por el método de vagina artificial es de menor volumen en comparación con el semen colectado por medio de electroeyaculación, debido a que en éste último las glándulas sexuales accesorias son estimuladas directamente por las corrientes eléctricas, logrando mayores

secreciones del fluido seminal (Austin et al. 1961, Eiler et al. 1987).

Otra de las causas de variación del volumen del semen es la época del año. En efecto, Rekwot et al. (1987) al comparar la época de seca (noviembre-abril) con la época de lluvia (mayo-octubre) en sementales cebú y Holstein durante un periodo de 2 años observaron que el volumen eyaculado tuvo un incremento significativo en la época de lluvias. Estos resultados difieren a los encontrados por Kumi- Diaka et al. (1981), quienes señalan que no existe variación estacional en el volumen seminal en razas cebuinas y europeas. Las diferentes conclusiones de ambos estudios se debe posiblemente a que el último las colecciones de semen fue menos frecuente (2 veces/mes) y por un periodo de estudio más corto (12 meses).

Tomar y Gupta (1984) analizando las características seminales en toros de la raza Haryana (Bos indicus) por medio de vagina artificial, encontraron una correlación negativa entre el volumen del semen y las variables de concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y la movilidad espermática inicial ($r=-0.321$, -0.331 y -0.056 respectivamente). Esto concuerda con lo descrito por Menendez et al. (1984), ya que igualmente notaron una correlación negativa entre volumen del eyaculado con movilidad inicial y concentración espermática ($r=-.02$ y $-.05$ respectivamente), en animales criollos, cebú y Holstein.

2.2.2 pH

El pH normal del semen bovino varía entre 6.4 y 7.4, siendo más fértil el eyaculado más ácido, siempre que dicha acidez este dentro de éstos límites (Furman et al. 1975, Rodríguez, 1981). Uno de los principales factores que afectan el pH de los eyaculados es el método de colecta. Normalmente el semen obtenido por electroeyaculador presenta una mayor alcalinidad que las muestras obtenidas por vagina artificial (Calderón, 1983; Chenoweth y Osborne 1978). Esta alcalinidad se debe principalmente a la secreción de las glándulas bulbouretrales. El semen alcalino (con alto pH) tiene una movilidad ligeramente reducida (Austin et al. 1961).

Existe considerable evidencia de que la estación del año no afecta significativamente el pH del semen. Igboeli y Rakha (1971), evaluando el semen colectado de 10 toros Angoni (Bos indicus) durante las estaciones de lluvias, frío y calor observaron valores similares entre estaciones. Esto se corrobora por un estudio similar donde indicaron que el pH del eyaculado fue 6.75 y 6.76 durante las épocas de invierno y verano respectivamente (Tomar y Gupta, 1984).

2.2.3 Concentración.

El conocimiento de la concentración espermática es de vital importancia para poder efectuar la dilución del semen. En el toro normal la concentración seminal varía entre 300, 000 a 1, 800, 000 células espermáticas por mm^3 . En general, los factores que influyen directamente sobre esta característica microscópica del semen pueden ser: la raza, la edad, el método de colecta, época del año, régimen alimentario y el número de eyaculados (Hahn *et al.* 1969; Kumi-Diaka y Zemjanis, 1978; Sekoni *et al.* 1982).

Hernández (1989), al realizar un estudio retrospectivo por 10 años con la finalidad de estimar el efecto de raza, época y región sobre la calidad del semen en ganado cebú Gyr, Indobrasil, Brahman y Guzerat comprobó que la concentración espermática del semen fue superior en las razas Gyr y Guzerat que en la razas Brahman e Indobrasil, observándose una diferencia altamente significativa ($P < 0.01$). Asimismo, éste mismo autor indica una correlación positiva de $r = 0.29$ entre la movilidad y la concentración espermática, así como también entre concentración seminal y el porcentaje de espermatozoides vivos, siendo esta de $r = 0.31$. Este trabajo coincide con otra investigación donde señalan una correlación positiva y altamente significativa entre movilidad inicial y el porcentaje de espermatozoides vivos resultando esta de $r = 0.55$, así como también entre la variable de concentración

espermática y movilidad inicial $r = 0.43$ (Tomar y Gupta 1984).

Varios investigadores (Amann y Almquist 1962, Flores et al. 1984, Hahn et al. 1969, Menendez et al. 1979), concuerdan que la edad del semental en la concentración espermiática del eyaculado, encontrándose los valores más altos entre los 2 a 6 años de edad. De la misma manera, éstos estudios indican que existe una reducción de la espermatogénesis en toros de avanzada edad, lo que puede ser producto de acumulación de traumas, efecto de estrés y enfermedades. Por otro lado, Kumi-Diaka et al. (1981), al observar el espermiograma de 10 toros: 5 Bos indicus y 5 Bos taurus de 3 a 10 años de edad, encontraron que la concentración espermiática fue significativamente más alta en toros jóvenes (3 a 7 años) en comparación con toros adultos (7 a 10 años). Esta baja producción espermiática en los toros adultos estuvo asociada con los cambios degenerativos de los túbulos seminíferos del parénquima testicular.

Existen discrepancias en los resultados de las evaluaciones del efecto de la época del año sobre la concentración del semen, Alba et al. (1982) observaron al estudiar 20 toros Brahman Americano (Bos indicus) durante un año una influencia estacional sobre la concentración seminal la cual fue notablemente elevada durante el periodo de sequía (noviembre-abril) respecto al periodo de lluvias (mayo-octubre). Igualmente Menendez et al. (1979) quienes analizaron 9,084 eyaculados producidos por 34 sementales

Cebú, obteniendo resultados similares. En contraste, Rekwot et al. (1987) mencionan datos diferentes al examinar las características del eyaculado en ganado Cebú, Holstein y sus cruza en las épocas de secas (noviembre - abril) y lluvias (mayo - octubre), ya que ellos notaron una diferencia significativa ($P < 0.05$) en favor de la época de lluvias con respecto a la concentración espermática, anormalidades y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Las controversias entre ambas investigaciones se debe quizá a que en los primeros estudios la época de lluvias correspondió a la época más calurosa del año, mientras que en éste último la temperatura ambiente promedio de la época de lluvias fue 29°C y de la época de secas de 33°C , existiendo diferencia significativa entre épocas ($P < 0.05$)

Por otra parte, Igboeli y Rakha (1971) señalan que la concentración seminal y el total de espermatozoides por eyaculado de toros Angoni (Bos indicus) de Egipto fueron significativamente diferentes durante las estaciones de lluvias, frías y calientes, evidenciándose los índices más bajos en esta última. De la misma manera, Chalapathy y Rao (1981) en ganado Bos indicus observaron una diferencia significativa entre los toros a los que se les proporcionó un alojamiento y un medio refrescante y aquellos que no tuvieron cobertizos ni fueron refrescados, resultando lo mismo al trabajar con ganado Bos taurus con el mismo procedimiento (Chalapathy y Rao 1982). Estos investigadores atribuyeron lo anterior al estrés climático que puede trastornar el

mecanismo termoregulador de los testículos y conducir a disturbios en la espermatogénesis, como es el daño de ciertas proteínas espermatogénicas termo-lábiles así como espermátidas jóvenes.

Diferentes autores (Latimer et al. 1982; Smith et al. 1981; Fields et al. 1982; Chenoweth, 1983) han demostrado que la circunferencia escrotal está intimamente ligada a la producción diaria de espermatozoides en toros jóvenes y que es altamente heredable. Además los mismos autores han encontrado que existe una importante relación entre la circunferencia escrotal y la edad de la pubertad de las vaquillas, es decir, que aquellos toros con una circunferencia escrotal superior al promedio tendrán hijas que presenten una pubertad más rápida que las hijas de toros promedio.

La producción diaria de espermatozoides es un parámetro auxiliar de la evaluación de la eficiencia reproductiva de los sementales, especialmente cuando se contemplan programas de inseminación artificial. Cardoso y Godinho (1985), al realizar estudios histológicos del testículo establecieron que la producción espermática por gramo de parénquima testicular es inferior en ganado Bos indicus a lo obtenido por otros autores con toros Bos taurus. Estas diferencias según los investigadores se deben a que el ganado cebú presentan un mayor índice de degeneración celular que afecta la mitosis de las espermatogonias. Sin embargo, es

necesario señalar que no existe diferencia significativa en la duración del ciclo del epitelio seminífero en ambas especies (Cardoso y Godinho, 1983).

2.2.4. Movilidad.

La mejor medida de la fertilidad es el porcentaje de concepciones. Sin embargo, la obtención de éste estimador de la fertilidad es demasiado costosa y requiere mucho tiempo. Por lo tanto, es evidente la necesidad de crear una prueba veraz para determinar la calidad del semen, donde los resultados estén altamente correlacionado con la fertilidad. Hartman (1965), Pickett (1975) y Pace et al. (1981) han demostrado que existe una alta correlación entre la fertilidad y la movilidad espermática. La movilidad espermática por sí misma no es una forma exacta de predecir la capacidad potencial de la fecundación de la célula espermática. No obstante, la movilidad espermática sigue siendo una herramienta útil para evaluar la viabilidad de los espermatozoides. La valoración de la prueba es subjetiva y requiere personal técnico con experiencia, y la precisión de esta determinación puede variar de un técnico a otro (Pickett et al. 1976; Díaz y Erices, 1984; Hafez, 1988).

Por otro lado, en el bovino se ha observado que una alta movilidad es más importante para la concepción que una elevada densidad espermática cuando no existe daño acrosomal (Linford et al. 1976). Sin embargo, en células con deterioro acrosomal no necesariamente se encuentra afectada la movilidad, pero sí su fertilidad. Además, se ha encontrado que el 68% del daño acrosómico está distribuido al azar entre la población de células móviles e inmóviles (Healey, 1969).

2.2.4.1 Evaluación de la movilidad en semen fresco.

Hay factores que pueden estimular o inhibir la actividad cinética de los espermatozoides, como son los iones, el ambiente osmótico, la temperatura y la fructosa del material seminal (Herrera, 1978, Silva, 1989). Dichos elementos condicionan la homeostasis, pH y presión osmótica del medio extracelular, el cual puede ser modificado por influencias de índole racial y ambiental, o en respuesta a diferentes estados fisiológicos. Pedroso y Kredl (1976), analizando la composición bioquímica del semen de 20 sementales Holstein y 20 Cebú durante un año, notaron mayores niveles de concentración de fructosa y ácido cítrico en los toros Holstein en relación con el ganado cebú. Según los autores estos valores superiores se deben a una mayor actividad androgénica testicular en el ganado Holstein. Por otro lado, los niveles de fructosa y cloruros en el contenido seminal fueron significativamente más alto en la época de lluvias (mayo - octubre) que en la época de seca (noviembre - abril), mientras que se encontraron niveles más bajo de ácido

citrico en el periodo de seca, esto implica que la secreción de las vesiculas seminales y las glándulas bulbouretrales estan afectadas por las condiciones climáticas.

Existe considerable evidencia de que el plasma seminal cumple funciones de transporte y sosten de la movilidad espermática. Sin embargo, particularmente en los toros es también perjudicial a la supervivencia espermática (Dott, 1974). Baas et al. (1983), quienes lavaron dos veces el semen bovino con una sustancia llamada Ficoll, resuspendido en una solución buffer, hasta quedar los espermatozoides inmóviles. Ellos observaron que el plasma seminal contiene dos factores separados: el primero es el que recupera la movilidad y el segundo inactiva en forma permanente al espermatozoide. El factor estimulante de la movilidad fue la fracción de bajo peso molecular y el efecto inhibitorio perteneció a la porción de alto peso molecular del plasma seminal. Estos factores internos son importantes porque aunado a otros elementos medio-ambientales determinan la movilidad y viabilidad de los espermatozoides del bovino.

Por otra parte, Foster et al. (1970) condujeron un experimento en ganado Angus y Hereford para determinar los cambios de las características del semen con siete eyaculaciones sucesivas a través de los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, con o sin previo estímulo sexual para cada eyaculación. Ellos mostraron que la concentración espermática declinó notablemente en eyaculados sucesivos, pero la movilidad inicial permaneció sin ningún

cambio entre eyaculados. No obstante, la movilidad inicial fue más alta ($P < 0.01$) para aquellos sementales que previamente se habían preparado sexualmente con una monta falsa. Los eyaculados obtenidos por medio de electroeyaculación presentaron mayor volumen y menor concentración espermática que aquellos colectados por vagina artificial, todo esto a pesar de que la movilidad inicial y la producción total de espermatozoides no hubo cambio significativo entre métodos de colección. De la misma forma, Almquist y Cunningham (1967) han presentado conclusiones similares con éstos mismos genotipos de toros.

Con respecto al efecto que puede ejercer la época del año sobre la movilidad espermática se han observado durante los meses más frescos (diciembre - marzo), los mejores resultados en ganado Bos indicus (Menendez et al. 1979; Menendez et al. 1984; Visintin et al. 1984). Otros investigadores han demostrado éste mismo fenómeno en ganado Bos taurus (Tuli y Singh. 1983; Raja y Rao 1983). Asimismo, el efecto de la época del año se reduce significativamente en ambas especies cuando se proporciona alojamiento y un medio refrescante a los animales (Chalapathy y Rao 1981; Chalapathy y Rao 1982). De lo anterior se puede deducir que la época de invierno es la más recomendable para la obtención y congelamiento de semen con la finalidad de alcanzar la máxima eficiencia reproductiva.

2.2.4.2 Evaluación de la movilidad del semen descongelado

Existe concordancia en que el rápido índice de descongelamiento de semen (75°C por 12 segundos) aumenta el porcentaje de la movilidad espermática y disminuye el número de espermatozoides con daño acrosomal (Berndtson et al. 1976; Senger et al. 1976). Sin embargo, el rápido índice de descongelamiento no puede ser recomendado en las condiciones de campo, ya que algunos errores en el tiempo de exposición causarían un sobre calentamiento y pérdida de la viabilidad del espermatozoide. Debido a esto se han realizado diferentes trabajos con la finalidad de obtener el método más adecuado de descongelamiento de semen. Alquimst et al. (1982) al comparar el tiempo de descongelamiento de las pajillas francesas de 0.5 ml; con agua caliente (32 a 35°C) y con un periodo de 9 y 40 segundos, notaron un incremento significativo en la fertilidad cuando el semen se descongeló a 40 segundos (66.3%) y un 64.4% cuando fue descongelado a 9 segundos. Dichos datos se basaron sobre el índice de no retorno a estro de 75 días con un total de 18,057 inseminaciones en vaquillas de primer servicio. Alquimst et al. (1979) observaron éste mismo fenómeno durante la época de frío, ya que la fertilidad fue ligeramente superior cuando la temperatura de las pajillas se elevó por arriba de 30°C por un tiempo de 30 segundos en comparación con aquellas que tuvieron un periodo más corto (12 segundos). Bajo estas circunstancias, el método de descongelamiento que se ha

utilizado más comunmente con resultados satisfactorios de fertilidad, ha sido el descongelar en agua caliente (37⁰C) por un tiempo de 30 segundos, para el semen procesado en pajillas de plástico de 0.5 ml (Landa y Almquist, 1979; Rhodes et al. 1985).

Lorton et al. (1984) al estudiar dos regímenes de extracción de semen en toros Holstein (3 a 10 años de edad), demostraron que no hay diferencia con respecto a la recuperación espermática del semen descongelado, ya que observaron resultados muy similares de 50.3 y 50.2% con el sistema de tres eyaculados por día, dos días a la semana, o dos eyaculados por día, tres días por semana respectivamente. Dicho semen fue obtenido por medio de vagina artificial y diluido en yema de huevo-citrato .

Existen otras causas que pueden afectar la fertilidad del semen, como el tiempo de enfriamiento y equilibramiento, porcentaje de glicerol, velocidad de congelamiento, tiempo de almacenamiento y tipo de diluyentes (Gaillard y Kupferschmied, 1982; Senger et al. 1983). Al respecto, Schenk et al. (1987) señalan que al utilizar tres diluyentes diferentes (yema de huevo-citrato, yema de huevo-Tes-Tris y leche homogeneizada) para el proceso de congelación de semen de 10 toros Holstein, observaron un efecto significativo sobre la movilidad post-descongelado con el diluyente yema de huevo-citrato. La movilidad espermática promedio post-descongelado fue 42, 36 y 39% respectivamente (P<0.01). Un

comportamiento diferente ha sido observado por Ahmad y Foote (1986) quienes encontraron que no existe efecto significativo para la movilidad individual post-descongelado cuando el semen fue diluido en leche entera, yema de huevo-Tris y yema de huevo-Tris detergente (sulfato lauril triethanolamina sódico), obteniéndose como promedio un 52% en la movilidad progresiva individual al descongelamiento en ambos diluyentes. Sin embargo, Foote y Arriola (1987) con éstos mismos diluyentes observaron resultados diferentes en cuanto a la fertilidad a los 60 días de no retorno a estro ($P < 0.05$)

Por otro lado, Pickett (1975) demostró al llevar a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica de los factores que afectan la utilización del semen congelado que la movilidad individual anterior a la congelación de 132 muestras de semen provenientes de 43 toros de seis razas, alcanzó un promedio de 62%, mientras que la movilidad del semen descongelado se redujo a un 44%. Todos éstos toros fueron seleccionados por su fertilidad y pertenecían en su gran mayoría a la raza Holstein. Asimismo, en otro estudio en el que se obtuvieron tres eyaculaciones de cada uno de 22 toros Angus no seleccionados las estimaciones obtenidas para la movilidad pre y postcongelación alcanzaron un 43 y un 15% respectivamente. Conclusiones similares mencionan Landa y Almquist (1979) al utilizar 9 eyaculados con un promedio de movilidad progresiva inicial de 62%, y una movilidad postdescongelado de 36%. Esto implica según los autores que en la mayoría de los laboratorios es normal que la movilidad

se reduzca en un 50 a 66% durante la congelación sin que esto sea motivo para eliminar el semen. No obstante, Krause (1972) y Hernández (1989) indican que el 80% de los casos, que existe buena calidad biológica del semen fresco (movilidad progresiva individual superior a 70%) coincide con resultados satisfactorios de congelamiento.

2.2.5 Anormalidades.

Las anomalías espermáticas se dividen en primarias y secundarias. Las primarias son debidas a una espermatogénesis defectuosa, ya sea temporal o permanente y manifestada por anomalías de cabeza, pieza intermedia o cuello y colas estrechamente enrolladas o dobles, así como gotas citoplasmáticas proximales. Las secundarias son causadas por efectos que influyen sobre los espermatozoides después de que estos han dejado los túbulos seminíferos, y durante su paso a través del epidídimo, detectándose como cabezas normales separadas, o precisamente debido a la separación del capuchón cefálico, gotas citoplasmáticas distales y colas flexionadas (Calderón 1983). En general el potencial de fertilidad es bajo cuando hay más de un 20% de espermatozoides con anomalías (Hafez, 1988), por lo cual es recomendable no utilizar dicho semen para el uso de inseminación artificial.

La variación estacional tiene un efecto notable sobre la morfología espermática en el ganado de tipo Bos taurus y Bos indicus. Saxena y Tripathi (1981) observaron al realizar un estudio con 3 toros F1 (cruza de Jersey con Sahiwal) una

mayor incidencia de anomalías espermáticas en la época de primavera y verano, resultando un menor porcentaje de anomalías en otoño e invierno. Por otra parte, Igboeli y Rakha (1971) al evaluar 10 toros Angoni (Bos indicus) durante las estaciones de lluvia (noviembre - marzo), fría (abril - julio) y caliente (agosto - septiembre) no encontraron efecto significativo con referencia a las anomalías primarias entre estaciones. Sin embargo, en la época caliente se presentó una alta incidencia de anomalías secundarias (superior a 10%) y de espermatozoides con presencia de gota citoplasmática. Esto se le atribuye a una disfunción de las glándulas sexuales accesorias y del epidídimo como consecuencia de las altas temperaturas del ambiente. Igualmente Avila et al. (1984) presentan resultados similares al trabajar con sementales Bos taurus y Bos indicus. De hecho, estas conclusiones de ambos estudios sirven para programar tanto la época de empadre, como el procesamiento de congelamiento de semen para lograr los mejores índices de fertilidad en el hato, ya que se ha demostrado que una alta incidencia de anomalías espermáticas interfieren en la fertilidad (Saxena y Tripathi, 1981)

Sekoni et al. (1982) al llevar a cabo un experimento con ganado Bos taurus, en el cual se obtuvieron siete eyaculados sucesivos por medio de electroeyaculación y siete eyaculados progresivamente 5 meses más tarde con intervalos de 10 minutos por el método de vagina artificial encontraron que el primer eyaculado obtenido por electroeyaculación

presentó mayores alteraciones de anomalías espermáticas que el séptimo eyaculado (18.65 y 7.6% respectivamente). De la misma forma, con el método de vagina artificial la incidencia de cabezas desprendidas fue más alta en el primer eyaculado (4.5%) y más baja en el séptimo eyaculado (1.75%). Estas alteraciones quizá se deben a la disfunción primaria del epidídimo, como también puede ser atribuido al prolongado descanso sexual de los toros. Es necesario mencionar que no existió diferencia en la totalidad de anormalidades de los eyaculados obtenidos por ambos métodos. Estos eventos concuerdan con lo descrito por Ghallab et al. (1987) quienes corroboran que no existe efecto significativo en lo relativo a la morfología espermática de los eyaculados continuos.

III. MATERIAL Y METODOS.

3.1 Localización del área de estudio.

El presente trabajo se realizó en el Centro Genético Copalar, ubicado en el Km 84.5 de la carretera Nautla-Poza Rica. Dicho Centro se encuentra localizado dentro del Municipio de Tecolutla del Estado de Veracruz, a 20° 30' de longitud Norte y 97° 01' de longitud Oeste, con una altitud de 3 msnm. De acuerdo a la clasificación de Köppen, modificada por García (1988), tiene un clima Am(e)w, que indica caliente húmedo con lluvias casi todo el año y una precipitación pluvial anual de 1576 mm, y una temperatura media anual de 23.3°C.

3.2 Animales.

El estudio se llevó a cabo con 60 sementales (30 Bos indicus y 30 Bos taurus), que se encontraban en fincas particulares alrededor del Centro Genético y en servicio activo de inseminación artificial. Las edades de éstos animales fluctuaron entre los 3 y 7 años, con un peso que varió de 450 a 900 Kg. Estos animales fueron manejados de acuerdo a las prácticas convencionales de salud y alimentación de la zona. Antes de iniciar el experimento se realizó un examen de salud reproductiva con la finalidad de tener animales en buenas condiciones de salud y de producción de semen. Desechando aquellos que presentaran alguna anomalía patológica (Zemjanis, 1984).

3.3 Experimento 1

Para conocer el efecto del método de colecta de semen sobre las características del eyaculado en el ganado Bos indicus y Bos taurus se utilizaron 20 sementales (10 cebú Gyr y 10 Pardo Suizo) los cuales fueron colectados una vez por el método de electroeyaculación y una vez por medio de vagina artificial, con ayuda de una vaca en estro. En cinco animales de cada especie la primera colección fue por vagina artificial y la segunda, 3 a 4 días después, por medio de electroeyaculación; en los otros cinco toros de cada especie se invirtió el orden de los métodos de colección. Cada colección de semen de un animal incluye tres eyaculados en un mismo día, o dos en los pocos casos en que sólo se obtuvieron dos eyaculados. El tiempo que se realizó este experimento fue aproximadamente de 15 días.

3.4 Experimento 2.

Con la finalidad de incrementar el número de observaciones para valorar el efecto del método de colecta de semen en ganado cebuino y europeo se formó otro grupo de 20 toros Bos indicus (11 Indobrasil y 9 Brahman) y 20 sementales del ganado tipo Bos taurus (Pardo Suizo), los cuales a su vez se dividieron en grupos de 10 animales del mismo genotipo respectivamente. Diez toros de cada especie fueron colectados por vagina artificial, y los otros diez de cada genotipo se colectaron por medio electroeyaculación. La colección incluyó tres eyaculados para cada método.

Para determinar el efecto del método de colecta sobre la recuperación de los espermatozoides después del descongelado, se congelaron 50 pajillas francesas de 0.5 ml en cada colecta de semen con una concentración de 30 millones de espermatozoides móviles por dosis. Los resultados de dichas muestras se vertieron en una hoja protocolaria que se preparó para tal efecto.

3.5 Evaluación del semen.

La evaluación macroscópica y microscópica se realizó en forma independiente para cada eyaculado, anotándose la identificación del seminal, fecha de colección, raza, número del eyaculado y método de colecta. Inmediatamente después de la colección del semen se evaluaron las siguientes características: volumen, pH, concentración espermática, movilidad en masa e individual del eyaculado .

El volumen del eyaculado se cuantificó en el tubo graduado utilizado para su colección, la concentración espermática fue determinada mediante el método de hematocitómetro o cámara de Spencer (Sorensen, 1984). La movilidad en masa se estimó a través de la observación de una gota de semen en un portaobjetos colocado sobre una termoplatina, la clasificación se realizó de acuerdo a la siguiente escala (Bustamante, 1980).

ESCALA		MOVILIDAD EN MASA.
Grado	0:	Movimiento nulo
Grado	I:	Movimiento estacionario o rotatorio débil (10-30% de células móviles)
Grado	II:	Movimiento oscilatorio o rotatorio sin olas ni remolinos (30-50 % de células móviles).
Grado	III:	Movimiento progresivo rápido pocas olas y remolinos (50-80% de células móviles)
Grado	IV:	Movimiento progresivo rápido con formación rápida de olas (80-90% de células móviles)
Grado	V:	Movimiento sumamente vigoroso y olas extremadamente rápidas (90-100% de células móviles).

La movilidad individual se analizó por observación microscópica de una pequeña gota de semen colocada entre porta y cubreobjetos a una temperatura de 38°C, clasificándose por escala porcentual a criterio del evaluador. El pH fue medido con tiras de papel indicador con un rango de 4 a 8.

Los criterios para poder congelar el semen en éstos experimentos fueron los recomendados por Hernández (1989), que consisten en eliminar cualquier eyaculado que al colectarse presente menos del 55% de la movilidad espermática en masa, lo mismo que aquellos con menos de 60% de células móviles y con una movilidad progresiva inferior a 70% al enfriarse el semen 5°C.

3.6 Dilución y congelamiento del semen.

El diluyente utilizado para la congelación de semen fue a base de leche semidescremada que se preparó poco antes de la colección. El diluyente A contiene 10 g de leche en polvo, 5% de yema de huevo, 1.0 g de fructosa, 3% de glicerina, 100 000 UI de penicilina y 100 mg de estreptomycin diluidos en 100 ml de agua bidestilada y se mantiene a 34°C. El diluyente B contiene los mismos ingredientes que el diluyente A, más 11% de glicerina y se mantiene a 5°C. Para llevar a cabo la dilución se determinó el volumen del semen, concentración espermática y la movilidad progresiva individual calculándose el diluyente necesario para lograr una concentración final de 60 millones de espermatozoides móviles por ml (Pickett et al. 1976;

Schenk et al. 1987). Primero se agregó el diluyente A, enfriándolo gradualmente hasta 5°C aproximadamente en 2 horas, posteriormente se estimó la cantidad del diluyente B que debería agregarse para que cada pajilla francesa de 0.5 ml tuviera 30 millones espermatozoides móviles por dosis. El diluyente B para administrarse se dividió en cuatro porciones añadiéndose cada una a intervalos de 15 minutos, quedando finalmente el semen diluido a un 7% de glicerina. Antes del congelamiento la dilución final se mantuvo a 5°C durante 4 a 6 horas para permitir que las células espermáticas tuvieran el proceso de equilibramiento con el diluyente, de modo que los espermatozoides estén bien protegidos durante el congelamiento y descongelamiento (Pickett et al. 1976). Posteriormente se realizó la prueba de capacidad de congelamiento del semen, que consiste en congelar y descongelar una pajilla francesa para cada eyaculado obtenido, la descongelación se realizó a 37°C por 30 segundos. Si existe una movilidad individual mayor de 30% en esta prueba se considera el eyaculado como satisfactorio. Después se imprimieron y envasaron en un cuarto frío a 5°C, en el cual se colocaron las pajillas a una 12 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 15 minutos y con los vapores de éste, se espera que el semen baje a una temperatura aproximadamente de - 70°C. Ya congeladas, las pajillas se sumergieron en el nitrógeno líquido (-196°C) del termo de almacenamiento.

3.7 Análisis estadístico.

Los resultados para todas las características del semen (volumen, pH, concentración espermática, movilidad en masa e individual y movilidad progresiva individual al descongelamiento), para el primer experimento fueron evaluadas por medio de un análisis de varianza basado en un modelo factorial (Gill, 1978).

$$Y_{ijk} = M + E_i + M_j + EM_{ij} + T(E)_{ik} + e_{ijk}.$$

donde:

Y_{ijk} = Una observación de las características seminales.

M = Media general.

E_i = Efecto de la i -ésima especie ($i = 1, 2$)

M_j = Efecto del j -ésimo método de colección ($j = 1, 2$)

EM_{ij} = Efecto de la interacción entre la i ésima especie y el j ésimo método

$T(E)_{ik}$ = Efecto del k -ésimo toro anidado en la i -ésima especie ($k = 1, 10$)

e_{ijk} = error aleatorio.

En un análisis preliminar se encontraron diferencias significativas de edad en los toros de cada especies con un promedio de 5.1 años en Bos taurus y 3.4 años para los Bos indicus, pero al usar la edad como covariable el incremento del coeficiente de determinación fue muy pequeño por lo que se conservó el modelo descrito.

Para valorar los datos de las características del semen del segundo experimento, donde los sementales fueron colectados por un sólo método, se utilizó otro modelo factorial.

$$Y_{ijk} = M + E_i + M_j + EM_{ij} + T(E, M)_{ijk} + e_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Una observación de características seminales

M = Media general

E_i = Efecto de la i -ésima especie ($i= 1,2$)

M_j = Efecto de la j -ésimo método ($j= 1,2$)

EM_{ij} = Interacciones entre la i ésima especie y el j ésimo método

$T(E,M)_{ijk}$ = Efecto del k -ésimo toro anidado en la i -ésima especie y en el j -ésimo método ($k = 1, .10$).

e_{ijk} = error aleatorio.

Este mismo modelo se aplicó sobre la información de los toros cebú, eliminando a los Bos taurus, a fin de comparar las razas Brahman e Indobrasil entre si.

Por otra parte, con la finalidad de conocer las asociaciones entre las variables estudiadas se hizo un análisis de correlación lineal simple en ambos experimentos.

IV. RESULTADOS

4.1 Resultados del experimento 1

En el cuadro 1 se observan los valores obtenidos para volumen, pH y concentración espermática entre grupos de acuerdo a la método de colección y especie. Como se puede apreciar se observó que el método de colección ejerció un efecto significativo para el volumen del semen ($P < 0.01$) notándose valores superiores en los animales colectados por electroeyaculación. Por otro lado, el promedio del pH de los eyaculados obtenidos por medio de vagina artificial fue inferior (6.96) al observado por el método de electroeyaculación (7.0), ($P < 0.01$). En cuanto a la concentración zoospermica el semen colectado por vagina artificial presentó promedios más altos ($P < 0.01$) con respecto al semen extraído por electroeyaculación (1053×10^6 vs. 786×10^6 espermatozoides por ml respectivamente).

El efecto del método de colección de semen referente a la movilidad en masa e individual, se observó que no existe diferencias significativas ($P > 0.05$). Aunque, en el promedio de la movilidad progresiva individual si varió significativamente ($P < 0.05$) entre el ganado Bos taurus (72%) y el ganado Bos indicus (67%). Por otra parte, la recuperación espermática al descongelamiento fue altamente significativa ($P < 0.01$) en favor al método de colecta por vagina artificial (cuadro 2).

En el cuadro 3 se presentan los cuadrados medios de los análisis de varianza para cada una de las características seminales evaluadas. Se observó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies con respecto al pH del eyaculado y la movilidad progresiva individual. Asimismo, se vió un efecto individual significativo del toro sobre el volumen ($P < 0.01$) y concentración seminal ($P < 0.05$). Además existió una interacción altamente significativa ($P < 0.01$) entre especies y el método de extracción de semen sobre el pH del eyaculado.

Cuadro 1. Promedio de las características seminales de los toros colectados alternativamente por vagina artificial y electroeyaculación.

ESPECIE	MC.	NE.	VOLUMEN (ml)	pH	CONCENTRACION ESP. (X 10 ⁶ por ml).
<u>Bos taurus</u>	VA	26	6.09 ± 1.3a	6.94 ± .05a	1075 ± 210a
<u>Bos indicus</u>	VA	23	6.89 ± 2.2ab	6.98 ± .03a	1032 ± 203a
<u>Bos taurus</u>	EE	23	6.72 ± 3.1b	7.00 ± .04b	829 ± 218b
<u>Bos indicus</u>	EE	22	8.20 ± 3.2c	7.00 ± .05b	745 ± 198b

MC = Método de colecta.

NE = Número de eyaculados

ab = Valores con diferente literal son estadísticamente diferentes (P<0.01)

abc = Valores de columna que no comparten al menos una literal son estadísticamente diferentes (P<0.01).

Cuadro 2. Promedio de la movilidad espermática de los seminales colectados alternativamente por vagina artificial y electroeyaculación.

ESPECIE	MC	NE	M O V I L I D A D %		
			EN MASA	INDIVIDUAL	INDIVIDUAL AL DESCONG.
<u>Bos taurus</u>	VA	26	78 ± 6.9a	73 ± 9.0c	48.0 ± 6.0a
<u>Bos indicus</u>	VA	23	76 ± 6.4a	69 ± 9.8d	44.5 ± 7.2a
<u>Bos taurus</u>	EE	23	77 ± 8.3a	71 ± 6.6c	40.0 ± 5.8b
<u>Bos indicus</u>	EE	22	74 ± 4.9a	65 ± 8.6d	36.5 ± 4.5b

MC = Método de colección

NE = Número de eyaculados.

ab. altamente significativo (P<0.01)

cd. significativo (P<0.05)

Cuadro 3. Cuadrados medios de los análisis de varianza de cada una de las características del semen colectado tanto por electroeyaculación como por vagina artificial.

F.V.	gl.	Vol	pH	Conc	MM.	MPI	gl. MPI Desc
Método	1	27.3**	.03**	1623179**	51.6	208.2	1 589.6**
Especie	1	14.5	.01*	121408	103.6	459.4*	1 123.5
Esp*met	1	1.8	.01*	9476	5.4	16.9	1 0.11
T(esp)	18	12.5**	.002	71570*	58.5	67.6	18 47.3
Error	70	5.1	.002	38263	45.7	80.9	17 31.3

** Altamente significativo (P<0.01)

* Significativo (P<0.05).

F.V.= Fuente de variación.

Esp*met = especie por método.

T(esp) =Toro(especie)

gl. = Grados de libertad.

Vol.= Volumen.

pH = pH del semen.

Conc.=Concentración espermática

MM = Movilidad en masa.

MPI = Movilidad progresiva individual.

MPI Desc = Movilidad progresiva individual al descongelamiento.

Los valores de movilidad, si bien se describen como porcentajes no son una medida de proporción del total, por lo que no se consideró conveniente aplicarles algunas transformaciones, además de que en un análisis preliminar no se encontró desviación significativa de éstas variables, con respecto a la distribución normal de probabilidades (Gill, 1978).

El volumen del semen no mostró correlación significativa ($P > 0.05$) con ninguna de las características seminales analizadas en éste estudio. Se encontró una correlación negativa y altamente significativa ($P < 0.01$) entre el pH del semen con la movilidad en masa, movilidad individual y la concentración espermática (Cuadro, 4). Es necesario indicar que no existieron correlaciones significativas entre el pH del eyaculado y la recuperación espermática del semen descongelado. Por otra parte, se observó una correlación altamente significativa de la movilidad en masa con la movilidad individual y concentración seminal. A su vez también se notó una asociación significativa ($P < 0.05$) entre la movilidad en masa y la movilidad individual del semen descongelado.

Por otro lado, la movilidad individual reveló una correlación altamente significativa ($P < 0.01$) con las variables de concentración seminal y la recuperación espermática al descongelamiento. Del mismo modo, se observaron resultados similares entre la concentración espermática y la movilidad progresiva individual al descongelamiento.

Cuadro 4. Correlaciones entre las características seminales en estudio (experimento 1).

	Vol	pH	MM	MPI	Conc	MPI DESC
Vol		0.16	-0.06	-0.007	-0.20	-0.29
		NS	NS	NS	NS	NS
pH			-0.28	-0.37	-0.47	-0.26
			**	**	**	NS
MM				0.72	0.47	0.34
				**	**	*
MPI					0.46	0.40
					**	**
Conc.						0.68
						**

NS = No significativo ($P > 0.05$)

* = Significativo ($P < 0.05$)

** = Altamente significativo ($P < 0.01$)

Vol = volumen.

pH = pH del semen.

MM = Movilidad en masa.

MPI = Movilidad progresiva individual.

Conc = Concentración espermática.

MPI DESC = Movilidad individual al descongelamiento.

4.2 Resultados del experimento 2

Los resultados en lo que respecta a los toros colectados solamente por un método de extracción de semen se muestran en el cuadro 5. Como puede observarse, el método de colección tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) para el volumen, el pH del semen y concentración espermática, ya que los animales trabajados por electroeyaculación presentaron valores superiores para el volumen del semen y el pH del eyaculado en comparación a los toros colectados por vagina artificial. En contraste, la concentración espermática fue mayor en los sementales trabajados por el sistema de vagina artificial..

En el cuadro 6 se observa que la movilidad en masa e individual no fue afectada ($P > 0.05$) por el método de colecta de semen. No obstante, el sistema de colección si ejerció una influencia altamente significativa sobre la recuperación espermática del semen descongelado, evidenciándose como promedio para esta característica un 47.7% para lo toros trabajados con vagina artificial y 37.5% por el sistema electroeyaculación.

De acuerdo con el análisis de varianza basado en un modelo factorial, se encontraron efectos altamente significativos ($P < 0.01$) de individualidad del toro, sobre el volumen del eyaculado y concentración espermática. No así para interacción entre especie y método (cuadro 7).

Por otro lado, al realizar un análisis de varianza exclusivamente para el ganado Bos indicus (Indobrasil y Brahman) tocante a las características seminales, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre razas.

Cuadro 5. Promedio de las características seminales de los toros colectados por un sólo método: electroeyaculación o vagina artificial.

ESPECIE	MC	NE	VOLUMEN (ml)	pH	CONCENTRACION ESP. (X 10 ⁶ por ml.)
<u>Bos taurus</u>	VA	26	5.59 ± 1.1a	6.95 ± .05a	1076 ± 175a
<u>Bos indicus</u>	VA	25	6.16 ± 1.2a	6.98 ± .04a	1026 ± 217a
<u>Bos taurus</u>	EE	24	8.66 ± 2.2b	7.00 ± .02b	791 ± 215b
<u>Bos indicus</u>	EE	22	8.50 ± 1.9b	7.00 ± .00b	772 ± 218b

MC = Método de colección.

NE = Número de eyaculados.

ab. difieren altamente significativo (P<0.01)

Cuadro 6. Promedio de la movilidad espermática en los sementales colectados solamente por un método: vagina artificial o electroeyaculación.

ESPECIE	MC	NE	M O V I L I D A D %		
			EN MASA	INDIVIDUAL	INDIVIDUAL AL DESCONG.
<u>Bos taurus</u>	VA	26	81 ± 9.8a	72 ± 14a	49.0 ± 8.9a
<u>Bos indicus</u>	VA	25	79 ± 9.9a	70 ± 13a	46.5 ± 9.0a
<u>Bos taurus</u>	EE	24	79 ± 7.2a	69 ± 11a	38.5 ± 5.9b
<u>Bos indicus</u>	EE	22	74 ± 7.1a	64 ± 9.0a	36.5 ± 4.5b

ab. altamente significativo (P<0.01)

MC = Método de colecta.

NE = Número de eyaculados.

Cuadro 7. Cuadrados medios de los análisis de varianza de las características seminales de los toros colectados por un sólo método: electroeyacuación o vagina artificial.

FV	gl	Vol	pH	Conc	MM	MPI	gl	MPI Desc
Método	1	164.0**	.028**	1656957**	210	216	1	1050.6**
Especie	1	0.52	.006	2734	234	216	1	50.6
Esp*met	1	4.04	.003	7136	32	68	1	0.62
T(E,M)	36	5.1**	.001	88066**	87	167	0	(1)
Error	57	1.6	.001	16901	74	144	36	59.6

** Altamente significativo ($P < 0.01$)

(1) No se estimó en el modelo porque cada toro sólo aparecía una vez.

gl = Grados de libertad.

FV. = Fuente de variación

Esp*met = Especie por método

T(E,M) = Toro (especie, método).

Vol. = Volumen.

pH = pH del semen.

Conc = Concentración

MM = Movilidad en masa.

MPI = Movilidad progresiva individual.

MPI Desc = Movilidad progresiva individual al descongelamiento.

En el cuadro 8 se muestran los coeficientes de correlación entre las variables estudiadas. Existió una correlación altamente significativa ($P < 0.01$) entre el volumen del eyaculado con el pH del semen y la concentración seminal. Además también se observó una correlación negativa significativa entre el pH del eyaculado y la concentración seminal ($r = -0.30$). Con respecto a la movilidad en masa, se asoció positiva y altamente significativa ($P < 0.01$) con las medidas de movilidad individual, concentración zoospermica y la recuperación espermática al descongelamiento.

La movilidad individual está altamente relacionada con la concentración seminal y la recuperación espermática del semen descongelado ($P < 0.01$), existiendo esta misma asociación entre la concentración espermática y la movilidad individual del semen descongelado.

Cuadro 8. Coeficientes de correlación para las variables del experimento 2.

	Vol	pH	MM	MPI	Conc	MPI. Desc
Vol		0.30 **	-0.10 NS	- 0.10 NS	-0.45 **	-0.30 NS
pH			0.07 NS	0.08 NS	-0.30 **	-0.18 NS
MM				0.91 **	0.44 **	0.77 **
MPI					0.50 **	0.75 **
Conc						0.70 **

NS = No significativo ($P > 0.05$)

** = Altamente significativo ($P < 0.01$).

Vol= volumen.

pH = pH del semen.

MM = Movilidad en masa.

MPI= Movilidad progresiva individual.

Conc = Concentración espermática

MPI Desc.= Movilidad individual al descongelamiento

V. DISCUSION.

Al comparar las características seminales de toros Bos indicus y Bos taurus en ambos experimentos se observó que el método de colección ejerció un efecto significativo en volumen, ya que los eyaculados obtenidos por medio de electroeyaculación presentaron un promedio superior al semen extraído por vagina artificial (7.4 y 6.8 ml respectivamente). Esto es semejante a lo publicado por Calderón (1983) y Avila et al. (1984), quienes trabajaron en ganado cebuino y europeo bajo condiciones del trópico mexicano, observaron que el volumen del eyaculado no se ve afectado por la raza, pero sí por el sistema de colección. Por otra parte, Hernández (1989), al realizar evaluaciones seminales de las razas cebuinas Gyr, Guzerat, Indobrasil y Brahman por el método de electroeyaculación encontró volúmenes promedio de 10.7, 10.3, 11.5 y 11.7 ml respectivamente, los cuales son superiores al volumen promedio (7.4 ml) encontrado en éstos trabajos. Herrera (1978) al extraer semen por electroeyaculación en razas cebuinas encontró también un volumen promedio más elevado al obtenido en los presentes experimentos. Es necesario señalar que tanto en el trabajo de Hernández (1989), como en el de Herrera (1978) los animales se colectaban rutinariamente por electroeyaculación logrando tener así un reflejo condicionado posiblemente más adecuado para el proceso de eyaculación, lo que podría explicar en parte el mayor volumen de semen en dichos trabajos. Por otro lado,

el volumen del eyaculado en los presentes estudios varió significativamente por el efecto del toro, lo que indica que el volumen depende también de la individualidad de los sementales, tal cómo lo menciona Menendez et al. (1984).

Con respecto al efecto del sistema de colección de semen sobre el pH del eyaculado, se observó en los dos experimentos que los eyaculados obtenidos por electroeyaculación presentaron valores más altos ($P < 0.01$) a los eyaculados extraídos por vagina artificial. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito por Chenoweth y Osborne (1978) y Calderón (1983), quienes señalan que las muestras obtenidas por medio de electroeyaculación presentan un pH más elevado. Austin et al. (1961) indican que el incremento del pH del semen obtenido por electroeyaculación posiblemente se debe a la secreción de las glándulas bulbouretrales, que son estimuladas directamente por las corrientes eléctricas, lo que provoca una mayor participación de las secreciones de estas glándulas en la composición final del eyaculado.

Por otra parte, el pH del eyaculado en el experimento 1, se notó un efecto significativo de especie y su interacción con el método de colecta. Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos por Igboeli y Rakha (1971) quienes citan que el pH no se ve afectado por la especie y época del año, posiblemente las diferencias observadas en ambos estudios se debe a que en el presente experimento, los toros fueron colectados alternativamente

por vagina artificial y electroeyaculación mientras que en el trabajo de Igboeli y Rakha (1971) se trabajaron los sementales por un sólo método.

Por otro lado, fue notable la diferencia que existió entre los métodos de colecta de semen en ambos experimentos con respecto concentración espermática, observándose valores de 1052 y 784 millones de espermatozoides por ml, para los toros trabajados por sistemas de vagina artificial y electroeyaculación respectivamente. Bajo esto mismo procedimiento de estudio, Almquist y Cunnighan (1967) y Foster et al (1970) mencionan que los eyaculados obtenidos por medio de electroeyaculación presentan mayor volumen y una menor concentración espermática, que los eyaculados de toros colectados por vagina artificial, a pesar de que la producción total de espermatozoides por eyaculado no cambio significativamente entre métodos de colección.

En ambos experimentos se encontraron efectos significativos de toro, sobre la concentración espermática, lo cual implica que ésta característica seminal fue afectada por la individualidad de los sementales tal cómo lo señalan Kumi-Diaka y Zemjanis (1978).

Abundando en el punto anterior, Cardoso y Godinho (1985), al realizar estudios relacionados a la histología de los testículos establecieron que la producción

espermática por gramo testicular es menor en los toros Bos indicus, que en el ganado Bos taurus. Empero, los presentes trabajos no se notaron diferencias significativas en cuanto a especies, por lo que se destaca que la producción espermática de los animales Bos indicus puede ser similar al ganado Bos taurus como lo indican también algunos investigadores (Alba *et al.* 1982).

En lo referente a la movilidad en masa e individual en los dos estudios se observó que el método de extracción de semen no influyó significativamente ($P > 0.05$). Al respecto, Foster *et al.* (1970) demostraron en ganado Bos taurus que la movilidad inicial permanece sin ningún cambio cuando los sementales fueron trabajados alternativamente por vagina artificial y electroeyaculación, oscilando sus resultados de un 60 a 70% de movilidad espermática. Por otra parte, en el primer experimento se notó un efecto significativo sobre la movilidad individual al contrastar los resultados por especie (Bos taurus vs. Bos indicus). Al respecto, Pedroso y Kredl (1976) al evaluar la composición bioquímica del semen de 20 sementales Bos taurus y 20 Bos indicus bajo condiciones tropicales notaron mayores niveles de concentración de fructosa y ácido cítrico en el plasma seminal de los toros Bos taurus en relación con el ganado Bos indicus. Por lo que la diferencia existente en el presente estudio, sobre esta característica quizá fue debida a los niveles más bajos de fructosa y ácido cítrico

en el ganado Bos indicus, ya que éstas sustancias químicas son factores estimulantes de la actividad cinética de los espermatozoides (Silva, 1989).

En los presentes estudios, los sistemas de colección de semen tuvieron influencia significativa ($P < 0.01$) sobre la recuperación espermática del semen descongelado resultando tener una movilidad promedio más alta los animales trabajados por el sistema por vagina artificial (47%) en confrontación con los animales trabajados por medio electroeyaculación (38%). Es necesario indicar que los resultados obtenidos en éstos experimentos para la movilidad individual al descongelamiento no fueron significativos al ser comparados por especie (Bos indicus vs. Bos taurus). Lo anterior contrasta con los resultados observados por Barwise *et al.* (1984) y Rhodes *et al.* (1985), quienes encontraron que la movilidad promedio del semen descongelado en el ganado Bos indicus bajo condiciones del trópico mexicano fue alrededor de un 30%, y de un 50% para el ganado Bos taurus. Cabe aludir que en éstas investigaciones el ganado Bos indicus fue colectado por medio de electroeyaculación y con el uso de vagina artificial los sementales tipo Bos taurus, por lo que el efecto observado por ellos puede ser debido al método de colección, más que a diferencias entre especies.

En efecto, el bajo porcentaje de recuperación espermática de los animales trabajados por

electroeyaculación quizá se debe al incremento del pH del eyaculado, lo cual reduce ligeramente la movilidad espermática (Austin et al 1961). Adicionalmente, existe la posibilidad de otros factores intrínsecos desconocidos en el semen extraído por diferentes métodos de colección de semen. Lo anteriormente expuesto abre la posibilidad de otras investigaciones relacionado a las propiedades bioquímicas de los eyaculados obtenidos por ambos métodos de colección.

Con respecto a las correlaciones se observó en el experimento 2, que el volumen del eyaculado tuvo una correlación negativa con la concentración espermática. Esto concuerda con lo descrito por Hernández (1989), quien indicó una correlación negativa entre el volumen del eyaculado con la movilidad inicial y la concentración espermática. Sin embargo, en el presente experimento el volumen también se asoció positivamente con el pH del eyaculado, diferente a lo publicado por Menendez et al. (1984) quienes evaluaron animales Criollos, Cebú y Holstein bajo condiciones de Cuba. Por otra parte, en el experimento 1, el pH del semen mostró un efecto negativo ($P < 0.01$) asociado con la movilidad en masa e individual. Este efecto es similar a lo observado por Austin et al. (1961). Sin embargo, en los dos presentes estudios se encontró que el pH está correlacionado negativamente con la concentración seminal. Esta correlación fue diferente a lo observado por Tomar y Gupta (1984), quienes no

encontraron ninguna correlación significativa entre estas variables.

En los presentes experimentos, la movilidad en masa e individual se vieron positivamente ($P < 0.01$) relacionados con la concentración zoospérmica y la movilidad progresiva individual al descongelamiento, coincidiendo con las observaciones de Menendez et al. (1984). Estas correlaciones tienen una utilidad práctica, ya que dependiendo de la calidad del semen fresco se puede predecir los resultados de la movilidad progresiva individual al descongelamiento.

Sin lugar a dudas, se necesitan mayores investigaciones con respecto a los resultados obtenidos en ambos estudios sobre del porcentaje de concepción, pese a que en el ganado bovino se ha observado que una alta movilidad es más importante que una elevada densidad espermática para la concepción cuando no existe daño acrosomal (Linford et al. 1976). Desafortunadamente en éstos experimentos no se evaluó el daño acrosomal, aunque se ha demostrado que el 68% del daño acrosómico está distribuido al azar entre la población de células móviles e inmóviles (Healey, 1969).

De acuerdo con los resultados obtenidos en éstos estudios se puede sugerir que para alcanzar los mejores resultados en cuanto a la movilidad espermática se utilice tanto para el ganado Bos taurus cómo el Bos indicus, el método de colecta por vagina artificial, pese a que en ésta última especie se consideraba un dilema el poder extraer el semen por el método de vagina artificial. Asimismo, también sería recomendable que los animales que se van a seleccionar como sementales y sometidos al proceso de congelación de semen, inicien su entrenamiento de extracción de semen a temprana edad por éste método para obtener los mejores resultados de fertilidad.

Futuros trabajos al respecto, que contemplen la posibilidad de evaluar las propiedades bioquímicas (iones, ácido cítrico y fructosa) de los eyaculados obtenidos por ambos métodos de colección. Así como también la valoración de un método más objetivo para la evaluación de la movilidad espermática donde se pueda calcular la velocidad de desplazamiento neto de las células.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

VI. LITERATURA CITADA.

- Ahmad, K. and Foote, H. R. : Posthaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotic and detergent. J. Dairy Sci. 69 : (2) 535-545 (1986).
- Alba, G. L.; Martinez, M. C. y Rodriguez, F. J. : Caracteristicas del semen de los toros Brahman Americano (Bos indicus) en condiciones de inseminación artificial en Cuba. Rev. Salud Anim. 4 : (1) 153-163 (1982).
- Almquist, J. O. and Cunningham, C. D. : Reproductive capacity of beef bulls. I Postpuberal changes in semen production at different ejaculation frequencies. J. Anim Sci. 26 : 174-181 (1967).
- Almquist, J. O.; Grube, E. K. and Rosenberger, L. J. : Effect of thawing time on fertility of bovine spermatozoa in french straws. J. Dairy Sci. 65 : 824-827 (1982).
- Almquist, J. O.; Rosenberger, L. J. and Branas, J. R. : Effect of thawing time in warm water on fertility of bovine spermatozoa in plastic straws. J. Dairy Sci. 62 : 772 (1979).
- Amann, P. R. and Almquist, J. O. : Reproductive capacity of dairy bulls VIII. Direct and indirect measurements of testicular sperm production. J. Dairy Sci. 15 : (6) 774-781 (1962)
- Austin, W. J.; Hupp, W. E. and Murphree, L. R. : Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina by electroejaculation. J. Dairy Sci. 44 : (11) 2292-2297 (1961).
- Avila, D. A.; Rodriguez, R. O.; Zapién, S. A.; Sánchez, A. R. y Vásquez, P. C. : Influencia de la temperatura ambiental sobre la calidad del semen en tres razas de bovino productores de carne. Tec. Pec. Mex. 47 : 95-101 (1984).
- Baas, W. J.; Molan, C. P. and Shannon, P. : Factors in seminal plasma of bull that affect the viability and mortality of spermatozoa. J. Reprod. Fert. 68 : 275-280 (1983).

- Barwise, L.; Galina, C.; Duchateau, A; Moreno, I. ; Soto, C. and Navarro, F. : Evaluation following short and long term storage of frozen semen from zebu cattle. Proc. 10th. Inter. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana Illinois 2 : 183 (1984).
- Berndtson, E. W.; Pickett, W. B. and Rugg, D. C. : Procedures for field handling of bovine semen in plastic straws. Proc. Sixth Tech. Conf. NAAB : 12 (1976).
- Berndtson, E. W. and Igboeli, G. : Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of holstein bulls electroejaculated after administration of oxytocin. J. Reprod. Fert. 82 : 467-475 (1988).
- Bustamante, C. G. : Acción del sulfóxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide del carnero durante la congelación. Tesis de Maestría. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1980.
- Calderón, M. O. : Importancia de la determinación del potencial reproductivo de sementales activos en tres diferentes explotaciones ganaderas por el método propuesto por la sociedad de teriogenología. Tesis de Maestría. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1983.
- Cardoso, F. M. and Godinho, H. P. : Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, (Bos indicus). Anim Reprod. Sci. 5 : 231-245 (1983).
- Cardoso, F. M. and Godinho, H. P. : Daily sperm of zebus (Bos indicus) estimated by quantitative histology of the testis. Theriogenology 23 : (6) 841-847 (1985).
- Chalapathy, V. P. and Rao Ramanohana, A. : Effect of improved housing on semen quality of Murrah bulls. Indian J. Anim Sci. 51 : (7) 761-765 (1981).
- Chalapathy, V. P. and Rao Ramanohana, A. : Effect of improved housing on semen characteristics of Jersey bulls. Indian. Vet. J. 59 : 274-280 (1982).
- Chenoweth, J. P. : Sexual behavior of the bull. A review. J. Dairy Sci. 66 : 173-179 (1983).

- Chenoweth, J. P. : Libido testing. In Current Therapy Theriogenology 2. edit Morrow. A.D. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1986.
- Chenoweth, J. P. and Osborne, G. H. : Breed differences in the response of young beef bulls to electroejaculation. Aust. Vet. J. 54 : (7) 333- 337 (1978).
- Chenoweth, J. P. and Osborne, G. H. : Breed differences in the reproductive function of young beef bulls in Central Queensland. Aust. Vet. J. 51 : (8) 405-406 (1975).
- Clarke, H. P.; Hewetson, W. R. and Thompson, J. P. : Comparison of the fertility of bovine semen collected by artificial vagina and electroejaculation from bulls with low libido. Aust. Vet. J. 49. 240 - 241 (1973).
- Diaz, O. H. y Erice, J. : Relación entre la variabilidad de algunos parámetros del espermiograma y la fertilidad en bovinos. Proc. 10th. Inter. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign. Illions 2 : 53-55 (1984).
- Dott, H. M. : The effects of bovine seminal plasma on the impedance change frequency and glycolysis of bovine epididimal spermatozoa. J. Reprod Fert. 38 : 147-156 (1974).
- Eiler, H.; Backus- Armstrong, S. and Smalling, D. J. : Effect of electroejaculation on progesterone and cortisol excretion in bovine semen. Am. J. Vet Res. 48 : (3) 492-495 (1987).
- Fields, J. M.; Hentges, F. J. and Cornelisse, W. K. : Aspects of the sexual development of Brahman versus Angus bulls in Florida. Theriogenology 18 : (1) 17-30 (1982).
- Flores, L. R.; Hernández, C. J. y Ruiz, D. R. : Evaluación de la capacidad reproductiva de sementales bovinos mantenidos en clima tropical húmedo. Tec. Pec. Méx. 46 : 96-103 (1984).
- Foote, H. R. and Arriola, J. : Motility and fertility of bull sperm frozen - thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. J. Dairy Sci. 70 : (12) 2642-2647 (1987).

- Foster, J.; Almquist, O. J. and Martig, C. D.: Reproductive capacity of beef bulls. IV. Changes in sexual behaviour and semen characteristics among successive ejaculations. J. Anim. Sci. 30 (1-3) 244-252 (1970).
- Furman, W. L.; Ball, L. and Seidel, E. G. : Electroejaculation of bulls using pulse of variable frequency and length. J. Anim. Sci. 40 : (4) 665-670 (1975).
- Gaillard, C. and Kupferschmied, H. : Thawing time and nonreturn rate of bovine semen frozen in fine french straws. Theriogenology. 18 : (4) 487-495 (1982).
- Galina, C. and Russell, j. : Research and publishing trend in cattle reproduction in the tropics: Part I. A global analysis. Animal Breeding Abstracts. 55 : (10) 743-749 (1987).
- García, E : Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. p 217, 1988.
- Ghallab, M. A.; Fattouh, M. S. and Elwishy, B. A. : The effect of sequence of ejaculation on frequency of sperm abnormalities in bulls. Br. Vet. J. 143 : 70-74 (1987).
- Gill, J. L. : Design and analysis of experiment in the animal and medical sciences. Vol I. The Iowa State Univer. Press Ames Iowa U.S.A. 1978.
- Hafez, E. S. E. Reproduction in farm animals. 5a ed. Lea and Febiger. Philadelphia p 633, 1988.
- Hahn, J.; Foote, H. R. and Seidel, E. G. : Testicular growth and related sperm output in dairy bulls. J. Anim. Sci. 29 : (1) 41-47 (1969).
- Hartman, G. C. : Correlation among criteria of semen quality. Fertility and Sterility. 16 : (5) 632-637 (1965).
- Healey, P. : Effect of freezing on the ultrastructure of spermatozoa of some domestical animals. J. Reprod. Fert. 18 : 21-27 (1969).

- Hernández, P. J. : Estudio sobre las características del semen y evaluación de la libido en toros Bos indicus. Tesis de Maestría. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1989.
- Hernández, L. J.; Rodríguez, R. O y González, P. E. : Evaluación de cuatro métodos para la colección de semen en borrego de Tabasco o Pelibuey. Tec. Pec. Méx. 30 : 45-51 (1976).
- Herrera, D. J. : Variaciones de las características del semen de las razas Indobrasil, Gyr, Guzerat y Brahman en los distintos meses y épocas del año. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1978.
- Hill, J. H.; Scott, S. F.; Homan, N. and Gassner, F. : Electroejaculation in the bull J.A.V.M.A. 128 : (8) 375-380 (1956).
- Igboeli, G. and Rakha, M. : Seasonal changes in the ejaculate characteristics of Angoni (shorthorn zebu) bulls. J. Anim. Sci. 33 : (3) 651- 654 (1971).
- Kumi-Diaka, J.; Nagaratman, V. and Rwuuan, S. J. : Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environmet. Vet. Rec. 3 : 13-15 (1981).
- Kumi-Diaka, J. and Zemjanis, R. : Seasonal variations in spermatogenesis in bulls indigenous to Nigeria. Br. Vet. J. 134 : (6) 537-540 (1978).
- Krause, D. : Estudio de la congelabilidad de semen como factor incluido en la clasificación de fertilidad potencial de reproductores bovinos. Archivos de Medicina Veterinaria- Chile 4 : (1) 31-32 (1972).
- Latimer, F. G.; L, L. Wilson and F, Cain. : Scrotal measurements in beef bulls. Heritability estimates, breed and test station effects. J. Anim. Sci. 54 : (3) 473-479 (1982).
- Landa, A. C. and Almquist, J. O. : Effect of freezing large numbers of straws of bovine spermatozoa in an automatic freezer on post-thaw motility and acrosomal retention. J. Anim. Sci. 49 : (5) 1190-1194 (1979).

- Linford, E.; Clover, F. A.; Bishop, C. and Stewart, D. L. : Relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. J. Reprod. Fert. 47 : 283-291 (1976).
- Lorton, P. S.; Winter, L. J.; Pace, M. M. and Sullivan, J. J. : Evaluation of two seminal collection regimens for mature Holstein bulls. J. Anim. Sci. 58 : (1) 1-5 (1984).
- Lunstra, D. D. and Echterkamp, E. : Puberty in beef bulls : acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. J. Anim. Sci. 55 : (3) 638-648 (1982).
- Maxwel, W. M. and Salomon, S. : Fertility of frozen thawed boar semen. Aust. J. Biol. Sci. 32 : 243-249 (1979).
- Menendez, A.; Guerra, D.; Dora, J. y Morales, R. : El seminal cebú en I.A. características del eyaculado. Rev. Cub. Reprod. Anim. 4 : (2) 41- 51 (1979).
- Menendez, A.; Morales, R.; Pérez, P. and Guerra, D. : Seasonal variation production of Holstein, Zebu, and Criollo bulls under artificial insemination conditions in cuba. Reproduction des ruminants en zone tropicale. Pointe a pitre 20 : 239-247 (1984).
- Orihuela, T. A. : Conducta estral del ganado cebú. Tesis de Maestría. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1982.
- Pace, M.; Sullivan, J.; Elliot, F.; Gahan, E. and Coulter, G. : Effect thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in .5 ml french straws. J. Anim. Sci. 53 : 693 (1981).
- Pedroso, R. y Kredl, F. : Influencias raciales y ambientales sobre las características bioquímicas del semen en toros Holstein y Cebú en Cuba. Rev. Cub. Reprod. Anim. 3 : 71-81 (1976).
- Pickett, W. B. : Factores que afectan la utilización del semen bovino congelado para lograr una eficiencia reproductiva. Centro de Información y Documentación Agropecuaria- INRA. Habana (1975).
- Pickett, B.; Berndtson, W. and Sullivan, J. : Techniques for processing and packaging bovine semen. Proc. Sixth. Tech. Conf. NAAB. p 17 (1976).

- Randall, S. : Breeding soundness examination of bulls. In Current Therapy in Theriogenology 2. Edit. Morrow. A.D. W.B.Saunders Co. Philadelphia. 1986.
- Raja, V. S. and Rao, R. A. : Semen characteristics of Brown Swiss Cross-bred bulls. Indian. Vet. J. 60 : 23-28 (1983).
- Rekwot. I. P.; Voh. A. A.; Oyepide. O. E.; Opaluwa. I. G.; Sekoni. O. V. and Dawada. M. P. : Influence of season on characteristics of the ejaculate from bulls in an artificial insemination centre de Nigeria. Anim. Reprod. Sci. 14: 187-194 (1987).
- Rhodes, F.; Galina, C.; Duchateau, A. and Soto, C. : Investigation into the properties of bovine semen. World Review of Animal Production 21 : (2) 15-19 (1985).
- Rodriguez, P. V. : Inseminación artificial. ed. Pueblo y Educación p, 47-89 Cuba. 1981.
- Saxena, B. V. and Tripathi, S. S. : Note on seasonal variation in abnormalities of spermatozoa of cross-bred bulls. Indian. J. Anim. Sci. 51 : (9) 891-894 (1981).
- Sekoni, V. O.; Osori, D. I. and Nagaratham, I. : Some ejaculate characteristics and observation on the libido of a South Devon bull in northern Nigeria. Brit. Vet. J. 138 : 168-173 (1982).
- Senger, L. P.; Becker, C. W. and Hillers, K. J. : Effect of thawing rate and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. J. Anim. Sci. 42 : (4) 932-936 (1976).
- Senger, L. P.; Mitchell, R. J. and Almquist, J. O. : Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .25 and in .5 ml french straws. J. Anim. Sci. 56 : (6) 1261-1268 (1983).
- Schenk, J. L.; Amann, R. P. and Allen, C. H. : Effects of extender and insemination dose on posthaw quality and fertility of bovine sperm. J. Dairy Sci. 70 : (7) 1458-1464 (1987).
- Silva, M. C. : Evaluación de la capacidad reproductiva del macho bovino. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida-México : 1-42 1989.

- Singleton, F. E. : Field collection and preservation of bovine semen for artificial insemination. Aust Vet J. 46 : 160- 163 (1970).
- Smith, F. M.; Morris, L. D.; Amoss, S. M.; Parish, R. N.; William, D. J. and Wiltbank, N. J. : Relationships among fertility, scrotal circumference, seminal quality, and libido in Santa Gertrudis bulls. Theriogenology. 16 : (4) 379-397 (1981).
- Sorensen, A. M. : Reproducción Animal. Principios y prácticas Mc. Graw Hill. México.D.F. 1984.
- Tasseron, F.; Amir, D. and Shindler, H. : Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. J. Reprod Fert. 51 : 461-462 (1977).
- Tomar, S. S. and Gupta, L. H. : Effect of season on sex desire and semen quality of Hariana bulls. Indian J. Anim. Health. 23 : (1) 37-40 (1984).
- Tuli, K. R. and Singh, Mehar. : Seasonal variation in freezability of buffalo semen. Theriogenology 20 : (3) 321-324 (1983).
- Visintin, J. A.; Barnabe, V. H.; Barnabe, R. C. and Viana, W. C. : Seminal characteristics of zebu bulls. Proc. 10 Th Inter. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois 2 : 69-71 1984.
- Zemjanis, R. : Reproducción Animal. Diagnóstico y técnicas y terapéuticas. Ed. Limusa. México D.F. 1984.