



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE TOROS CRIOLLO LECHERO TROPICAL

ROBERTO DE JESÚS VILLATORO SALINAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE TOROS CRIOLLO LECHERO TROPICAL realizada por el alumno: ROBERTO DE JESÚS VILLATORO SALINAS, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ

DIRECTOR DE
TESIS


DR. ADALBERTO ROSENDO PONCE

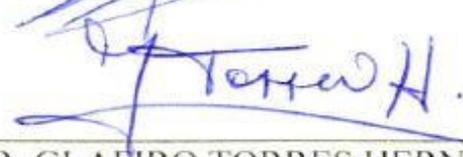
ASESOR


DR. RODOLFO CANSECO SEDANO

ASESOR


DR. CÉSAR CORTÉZ ROMERO

ASESOR


DR. GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2013

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por brindarme la oportunidad de lograr una meta más en la vida.

A mi familia

Mis padres, Maximino Roberto Villatoro de León y Norma Salinas Ruíz, quienes me infundieron el rigor que guían mi transitar por la vida.

Mis hermanos, Irma, Gladys Azucena y Ángel Israel

Por su gran confianza, cariño y apoyo incondicional, este logro también es de ustedes.

Gracias por confiar en mí y que siempre estaremos unidos. Dios los bendiga.

A la familia Salinas Ruíz

Por los grandes momentos que hemos compartido y por mantenernos unidos, aun en la distancia, en especial a mi tío Enrique Salinas Ruíz, que me brindo toda su confianza y apoyo incondicional durante estos dos años. Le deseo que le vaya bien en toda su vida, que dios lo bendiga.

A mi consejo particular

Quiero expresar mi agradecimiento por su incondicionable colaboración para llevar a cabo este trabajo en todo momento y su hora.

Al Dr. Carlos Miguel BECERRIL PÉREZ, agradezco su amistad y confianza, y a la participación en la revisión y corrección del presente estudio.

Al Dr. Adalberto ROSENDO PONCE, agradezco su amistad y confianza, por el esfuerzo de su participación en la realización de esta investigación.

Al Dr. César CORTEZ ROMERO, por sincera amistad y confianza, por los conocimientos transmitidos durante mi trabajo de campo, por sus sugerencias y por su gran participación en la realización de esta investigación.

Al Dr. Rodolfo CANSECO SEDANO, por brindarme su amistad y confianza, por los conocimientos transmitidos durante mi trabajo de campo, por sus sugerencias y por su gran participación en la fase de campo y en la realización de esta investigación.

Al Dr. Glafiro TORRES HERNÁNDEZ, agradezco su amistad y confianza, por su colaboración para la realización del Proyecto de Investigación.

A mis amigos

Froylan Rosales Martínez y Ángel Ríos Ortíz, por su confianza, amistad y apoyo que siempre me han brindado; y decirles que tienen un amigo que le brindará apoyo siempre.

A don Andrés, que me brindó su amistad, confianza y apoyo en todo momento. Sobre todo que me apoyo en el manejo del ganado Criollo Lechero Tropical.

Al colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), quien financió mi estancia durante la maestría y parte del Proyecto de Investigación.

Al colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, quien nos financió durante el Proyecto de Investigación el alimento comercial que se les proporciono a los toros Criollo Lechero Tropical.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Fisiología de los testículos.....	3
2.1.1. Gametogénesis	3
2.1.2. Espermatogénesis	3
2.2. Control endocrino de la función testicular	5
2.2.1. El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal	5
2.2.2. Generador de pulso de GnRH	6
2.3. Fisiología del comportamiento sexual del macho	7
2.3.1. Libido y capacidad de servicio.....	7
2.4. Exámenes de órganos sexuales externos	9
2.4.1. Examen del escroto	9
2.4.2. Examen de testículos.....	10
2.4.3. Examen de epidídimo.....	10
2.4.4. Examen de pene y prepucio	10
2.4.5. Circunferencia escrotal.....	11
2.5. Factores que afectan la calidad seminal	11
2.5.1. La temperatura.....	12
2.5.2. El estrés	12
2.5.3. Frecuencia de colecta	12
2.5.4. Nutricionales	12
2.5.5. Condición corporal.....	13
2.5.6. La edad	13
2.6. Manejo sanitario	13
2.6.1. Sanidad.....	14
2.6.2. Gestión de salud	14

2.7. Semen	14
2.7.1. Definición de espermatozoide	14
2.7.2. Morfología del espermatozoide	14
2.8. Colección de semen con vagina artificial (VA).....	15
2.9. Evaluación macroscópica del semen	16
2.9.1. Volumen	16
2.9.2. Consistencia	16
2.9.3. Color.....	17
2.9.4. pH.....	17
2.10. Evaluaciones microscópicas del semen	17
2.10.1. Movilidad masal	17
2.10.2. Movilidad individual	18
2.10.3. Concentración espermática	18
2.10.4. Morfología espermática	19
2.11. Método para calcular la concentración espermática.....	20
2.11.1. Método manual (Cámara de Neubauer)	20
2.12. Proceso zoosanitario del semen de animales domésticos	20
2.12.1. Definiciones y abreviaturas	20
2.12.2. Especificaciones	22
2.12.3. Método de prueba y muestreo	25
2.12.4. Importaciones	25
2.13. Especie bovina	25
2.13.1. Colección de semen.....	26
2.13.2. Manejo durante la colección de semen	26
2.13.3. Manejo del semen en el CEPROSEM y LAPROSEM	26
2.13.4. Medidas de control	26
III. JUSTIFICACIÓN	28

3.1. Problema de investigación.....	28
3.2. Justificación del problema	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Localización del área de estudio.....	29
4.2. Fuente de datos	29
4.3. Manejo de animales y colecta de semen.....	29
4.4. Variables de respuesta continuas	30
4.5. Variables de respuesta discreta.....	31
4.6. Análisis estadístico	31
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	38
VII. LITERATURA CITADA	39

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Duración de las etapas del ciclo del epitelio seminífero en tres especies.....	5
Cuadro 2. Diferencia entre temperatura corporal y testicular del toro.....	9
Cuadro 3. Promedio de la circunferencia escrotal en toros de acuerdo a los rangos de edad.....	11
Cuadro 4. Clasificación de la movilidad masal del semen.....	18
Cuadro 5. Clasificación de la movilidad individual del semen.....	18
Cuadro 6. Clasificación de la morfología espermática y frotis de vivos y muertos del semen.....	19
Cuadro 7. Características seminales de sementales Criollo Lechero Tropical en dos épocas del año (medias mínimo cuadráticas \pm error estándar).....	33
Cuadro 8. Frecuencias estimadas (%) de características seminales discretas de toros Criollo Lechero Tropical en dos épocas del año.....	35
Cuadro 9. Características seminales de sementales Criollo Lechero Tropical agrupadas por movilidad masal (medias mínimo cuadráticas \pm error estándar).....	36

CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE TOROS CRIOLLO LECHERO TROPICAL

Roberto de Jesús Villatoro Salinas, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN

Las características seminales de sementales Criollo Lechero Tropical (CLT) son poco conocidas y son requeridas para producir dosis de semen para inseminación artificial (IA) y sementales de alto valor genético todo el año. El objetivo del presente estudio fue caracterizar el semen de sementales CLT en dos épocas del año, fresca (enero) y calurosa (mayo) en la región central de Veracruz, México, de clima cálido subhúmedo, precipitación y temperatura media anual de 1060 mm y 26.4 °C. Se utilizaron 70 muestras de semen provenientes de siete sementales de 25.6±1.68 meses de edad y 319.14±6.24 kg, alimentados en pastoreo de zacate Pará (*Brachiaria mutica*) y un suplemento comercial con 18 % de proteína (4 kg d⁻¹ animal⁻¹). Se recolectaron cinco muestras de semen por semental en periodos de 4 d cada una y en cada época del año utilizando vagina artificial. Las variables de respuesta continuas se analizaron con un modelo lineal mixto con mediciones repetidas utilizando el procedimiento MIXED del SAS y las variables discretas utilizando el procedimiento GLIMMIX. La circunferencia escrotal (CE) fue de 34.2±0.24 cm y la correlación $r = 0.55$ ($p \leq 0.05$) con el volumen de eyaculado (VE). No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre épocas para VE, espermatozoides vivos y consistencia lechosa, con media y porcentaje estimados superiores de 4.0, 80.0 y 82 %, para ambas épocas; en la época calurosa la concentración espermática $1196.6 \pm 77.8 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ($p \leq 0.004$), la movilidad individual 75.7 ± 5.4 % ($p \leq 0.066$), los espermatozoides normales 80.8 ± 1.5 % ($p \leq 0.014$), la movilidad masal de remolinos rápidos 65.8 % ($p \leq 0.064$) y el color blanco 82.9 % ($p \leq 0.009$) fueron mayores que en la época fresca. Se concluye que la época calurosa no tuvo efectos detrimentales en las características seminales de los sementales jóvenes CLT, los cuales se consideran aptos para utilizarse en IA o monta natural.

Palabras clave: Semen, bovino criollo, climas cálidos, Veracruz.

SEMINAL CHARACTERISTICS OF TROPICAL MILKING CRIOLLO BULLS

Roberto de Jesús Villatoro Salinas, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

ABSTRACT

The seminal characteristics of Tropical Milking Criollo bulls (CLT) are not well known and are required to produce semen doses for artificial insemination (AI) and bulls with high genetic value all year around. The aim of this study was to characterize the semen of CLT bulls in two seasons, fresh (January) and hot (May) in the central region of Veracruz, Mexico, which has a warm subhumid climate, precipitation and temperature annual means of 1060 mm and 26.4 °C respectively. Seventy samples of semen were used from seven bulls of 25.6±1.68 months of age and 319.14±06.24 kg, fed on (*Brachiaria mutica*) grass and commercial supplement with 18 % protein (4 kg d⁻¹ animal⁻¹). Five samples of semen were collected per bull in 4 d periods each and in every season using artificial vagina. The continuous response variables were analyzed with a mixed linear model with repeated measures using the SAS MIXED procedure and the discrete variables using the GLIMMIX procedure. The scrotal circumference (SC) was 34.2±0.24 cm and the correlation with ejaculate volume (VE) was $r= 0.55$ ($p\leq 0.05$). No significant differences ($p>0.05$) were found between seasons for VE, live sperm and milky consistency, with an estimated mean and percentage higher than 4.0, 80.0 and 82.0 %, for both seasons, during the hot season the sperm concentration $1196.6\pm 77.8 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ($p\leq 0.004$), the individual mobility 75.7±5.4 % ($p\leq 0.066$), the normal sperm 80.8±1.5 % ($p\leq 0.014$), the fast swirls gross mobility 65.8 % ($p\leq 0.064$) and the white color 82.9 % ($p\leq 0.009$) were higher than in the cool season. It is concluded that the hot season had not detrimental effects on semen characteristics of young CLT bulls, which are considered suitable to use in AI or natural mating.

Keywords: Semen, criollo cattle, warm climates, Veracruz.

I. INTRODUCCIÓN

El ganado Criollo Lechero Tropical (CLT) tiene su origen en los bovinos españoles introducidos a partir del segundo viaje de Cristóbal Colón en 1493, en lo que actualmente es República Dominicana y Haití (Rouse, 1977). Ante la abundancia de pastizales, el ganado se adaptó a las condiciones locales y desarrolló características que le permitieron sobrevivir y reproducirse exitosamente en los ambientes cálido húmedos de América (FAO, 1981). En México, el hato de ganado CLT con mayor número de animales e información genealógica y productiva es propiedad del Colegio de Postgraduados (CP). Este hato proviene del ganado introducido a México de Nicaragua y Costa Rica en la década de los años 60 del pasado siglo por el Dr. Jorge de Alba y de animales criollos mexicanos de la vertiente del Océano Pacífico. Características externas del CLT incluyen pelo corto, escaso y brillante, piel gruesa y pigmentada, arrugas alrededor de los ojos y cuello y ocasionalmente en la frente; el color del manto puede ser de bayo a rojo con o sin cabos negros (de Alba, 2011).

Se han publicado estudios sobre características reproductivas como el número de servicios por concepción, edad al primer parto e intervalo interparto de la hembra CLT han sido publicados (de Alba y Kennedy, 1994; Rosendo-Ponce y Becerril, 2002). Sin embargo, poco se conoce de las características seminales de los sementales CLT con evaluaciones genéticas de caracteres productivos, las cuales son de interés debido a la necesidad de producir dosis de semen para inseminación artificial (IA) destinadas a los mercados locales e internacionales y para la distribución de sementales de alto valor genético entre los criadores de la raza y productores comerciales de leche.

La caracterización del semen de los sementales CLT puede realizarse a edad temprana, ya que su valoración genética se realiza con información de los progenitores, en concordancia con la prospectiva de valoraciones genómicas para el futuro. Es necesario conocer la variación en la calidad del semen de los toros CLT en condiciones adversas de altas temperaturas y humedad relativa, para prever el posible manejo del semental bajo tales condiciones.

Estudios recientes de la capacidad reproductiva de toros de razas criollas similares al CLT han sido realizados en el Criollo Limonero de Venezuela (Madrid *et al.*, 2011), razas lecheras

Bos taurus de origen templado en una región subtropical (Fiaz *et al.*, 2010) y de mestizos *Bos taurus* x *Bos indicus* en la región tropical (Prieto *et al.*, 2007).

En el trópico cálido, la producción de espermatozoides puede ser reducida durante la época de calor (Fields *et al.*, 1979; Rekwo *et al.*, 1987); sin embargo, las variaciones estacionales son atribuibles a otros factores ambientales además de la temperatura. La valorización de la calidad seminal es una de las herramientas de análisis más empleadas en la clasificación de los machos utilizados para monta directa o programas de (IA), ya que permite determinar la fertilidad del toro y conocer si el proceso de espermatogénesis ha sido afectado negativamente (Barth, 2001). Metodologías para la evaluación de la capacidad reproductiva de los toros han sido propuestas e incluyen inspecciones físicas y sanitarias del animal, así como de características seminales relevantes (Irons *et al.*, 2007). El objetivo del presente estudio fue caracterizar el semen de sementales Criollo Lechero Tropical en dos épocas del año, una fresca y la otra calurosa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Fisiología de los testículos

Los testículos tienen dos funciones básicas: la producción y secreción de la testosterona y otras hormonas a través de la esteroidogénesis y la producción de los espermatozoides a través del proceso conocido como espermatogénesis. Estas dos funciones ocurren en las células de Leydig y los túbulos seminíferos, respectivamente. Tanto la espermatogénesis como la esteroidogénesis dependen de la acción de 2 hormonas gonadotrópicas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Estando ambos procesos íntimamente relacionados, ya que son necesarios niveles adecuados de testosterona para que se efectúe la producción normal de espermatozoides (Amann y Schanbacher, 1983; Amann y Walker, 1983).

2.1.1. Gametogénesis

Todas las células normales son capaces de reproducirse así mismas; sin embargo, las células sexuales o germinales son las únicas que pueden iniciar la reproducción de todo un organismo. Una secuencia especial llamada gametogénesis, propicia el desarrollo de las células sexuales. La gametogénesis incluye la meiosis (reducir), etapa durante la cual el número cromosómico se modifica desde un número diploide ($2n$), característico de las células somáticas, el número haploide (n), que caracteriza a las células sexuales maduras. La gametogénesis incluye también la diferenciación de los óvulos y de los espermatozoides, que consiste básicamente en la acumulación de materiales nutritivos en el citoplasma del óvulo y la aparición del flagelo en los espermatozoides (Ruíz, 1988).

2.1.2. Espermatogénesis

Los espermatozoides se originan en los órganos reproductores (testículos) por medio de una secuencia llamada espermatogénesis, que es una serie de transformaciones que culmina en la formación de espermatozoides a partir de las espermatogonias, sin que se altere el número de estas. Este proceso involucra la división mitótica de la espermatogonia A1 para formar de manera consecutiva células más diferenciadas conocidas como espermatogonias A2, A3, B1 y B2. Este último tipo celular se divide para formar 2 espermatocitos primarios que entran a la meiosis formando los espermatocitos secundarios y finalmente las espermátidas (Amann y Schanbacher, 1983).

Es el proceso biológico de la transformación gradual de las células germinales en espermatozoides, durante un periodo de tiempo dentro de los límites de los túbulos seminíferos de los testículos. Este proceso involucra la proliferación celular de las divisiones mitóticas, duplicación de cromosomas, recombinación genética, reducción y división meiótica, hasta producir espermátides haploides y la diferenciación terminal de las espermátides en espermatozoides (Knobil y Neil, 2003).

La espermatogénesis incluye 2 fases: la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren división celular hasta transformarse en espermátides y la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Hafez y Hafez, 2000).

Durante la transición entre la profase y la metafase de la primera división meiótica se puede dividir la profase en 5 etapas: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diasinesis. Al concluir la sinapsis (cigoteno), el número de filamentos es dos veces menor del que se podía observar en el leptoteno y las estructuras visibles del núcleo son ahora cromosomas bivalentes en vez de únicos. Durante el paquiteno se pueden observar cromosomas homólogos colocados lado a lado. En el diploteno las cuatro cromátides se mantienen unidas por el centrómero, los cromosomas homólogos parecen repelerse uno a otro, haciendo que sus filamentos se separen longitudinalmente en algunas áreas y formen lazos. El acortamiento de las tétradas se lleva a cabo durante la diasinesis donde se observa que representan la mitad del número cromosómico. Al terminar la profase meiótica, las tétradas toman una apariencia ovalada o angular y van a ocupar sus respectivos lugares en el plano ecuatorial (Ruíz, 1988).

La primera de las 2 divisiones celulares de la secuencia meiótica separa a los cromosomas homólogos (cromátidas no hermanas) que se aparearon durante la etapa del cigoteno. El número cromosómico de un espermátida es haploide, lo mismo que en el espermatocito secundario. Sin embargo, los cromosomas de las espermátidas son unipartitas (una parte del cromosoma original), mientras que los del espermatocito secundario son bipartitas (mezcla única de los cromosomas originales: materno y paterno). La segunda división, llamada también división ecuatorial es de tipo mitótico, ya que separa a las cromátidas hermanas duplicadas. El proceso final de la espermatogénesis es una complicada diferenciación llamada espermiogénesis. Mediante una secuencia progresiva de cambios, cada una de las espermátidas relativamente voluminosas, esféricas e inmóviles, se transforma en un

espermatozoide pequeño, alargado y móvil, típicamente compuesto por tres partes: cabeza, porción central y cola (Ruíz, 1988).

La duración de cada etapa del ciclo del epitelio seminífero varía con la especie, así como la duración del ciclo del epitelio seminífero (Senger, 2003). Variaciones en la etapa, largo ciclo y el tiempo total necesario para la espermatogénesis se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Duración de las etapas del ciclo del epitelio seminífero en tres especies.

Etapa	Toro	Caballo	Carnero
I	4.2	2.0	2.2
II	1.2	1.8	1.1
III	2.7	0.4	1.9
IV	1.7	1.9	1.1
V	0.2	0.9	0.4
VI	0.8	1.7	1.3
VII	1.1	1.6	1.1
VIII	1.6	1.9	1.0
Total	13.5	12.2	10.1
Espermatogénesis/días	61	55	47

Modificado de Senger (2003)

2.2. Control endocrino de la función testicular

El hipotálamo, integrante del sistema nervioso central, es el regulador de la actividad testicular a través de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), un decapeptido secretado del hipotálamo al sistema porta, alcanzando los gonadotropos y provocando la secreción pulsátil de LH y la descarga de FSH (Amann y Schanbacher, 1983). El estímulo de la GnRH ocasiona la secreción inmediata de LH; mientras que la secreción de FSH es lenta y gradual (Schanbacher *et al.*, 1983). La LH y la FSH son esenciales para el buen funcionamiento de las células de Leydig y las células de Sertoli, respectivamente (Amann y Walker, 1983).

2.2.1. El eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal

El eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal es un sistema con regulación propia. La secreción de LH está controlada por una compleja interacción entre los esteroides y la GnRH. En machos

adultos, la secreción de LH provoca un aumento inmediato en la concentración de testosterona en la sangre. La testosterona, así como otros andrógenos y estrógenos, inhiben a su vez la secreción de LH a través de un mecanismo de retroalimentación negativo. Se ha observado que la secreción de LH y FSH se incrementa después de la castración, lo que indica la presencia de algún factor inhibidor en los testículos controladores de la secreción de ambas gonadotropinas (Amann y Schanbacher, 1983). La regulación de las funciones sexuales se realiza en estrecha colaboración de los sistemas nerviosos centrales y endocrinos y el centro de esta regulación está representado por el sistema hipotálamo-hipofisiario. Este sistema regulador a través de impulsos nerviosos neurohormonales (factores de liberación) y hormonales (gonadotropinas hipofisiarias), estimula la actividad de los órganos terminales (testículos) que secretan sus propias hormonas. Las hormonas testiculares están representadas por los andrógenos, que influyen en la función y estructura de los conductos testiculares, glándulas sexuales accesorias y participan bajo la influencia de los estímulos hipotalámicos específicos el lóbulo anterior de la hipófisis produce dos hormonas gonadotróficas (FSH y LH). Estas gonadotropinas actúan sobre las estructuras testiculares, células de Leydig, y túbulos seminíferos, (células germinales y células de Sertoli) y así rigen las 2 actividades fundamentales del testículo: a) función endocrina, (células de Leydig y de Sertoli) y b) exocrina, producción de gametos (epitelio germinal).

2.2.2. Generador de pulso de GnRH

La suposición original de que cada pulso de la secreción de gonadotropinas (LH y FSH) corresponde a uno de GnRH, liberado por las células neuroendocrinas del hipotálamo ha sido confirmado recientemente (Caraty *et al.*, 1989).

Se supone que cada pulso de secreción de GnRH dentro del sistema porta hipofisiario, es la suma de la secreción de un numeroso grupo de células productoras de GnRH. Hasta el momento no se ha aclarado como las hormonas productoras de GnRH participan en el desarrollo, conservación e intensidad de la libido y reflejos sexuales. Sin embargo, los testículos producen también los estrógenos, cuya función no está bien esclarecida y la inhibina que controla la secreción de FSH. Se sugiere que el sistema adrenérgico o dopaminérgico pueden controlar su actividad. La morfina tiene efectos similares, los cuales pueden ser modificados abruptamente cuando se administra naloxone, un antagonista de los opioides (Van *et al.*, 1983), indican que la reducción de la secreción de los pulsos de LH ocasionada por la progesterona puede ser modificada por la administración de naloxone,

sugiriendo que la acción fisiológica de esta hormona es mediada por los opioides endógenos, lo mismo se ha observado con la acción de la testosterona. Se concluye que todos los procesos reproductivos dependen de una cascada de eventos neuroendocrinos iniciados por el generador de pulso de GnRH. Las células productoras de GnRH registran la actividad eléctrica del generador de pulso de GnRH, de las fibras de GnRH o de otros elementos que eventualmente hacen sinapsis con ellas.

2.3. Fisiología del comportamiento sexual del macho

El patrón básico del comportamiento sexual del macho se desarrolla de manera innata, poniéndose de manifiesto cuando se encuentra con una hembra en estro, aunque es muy probable que la libido de un semental esté determinada genéticamente, la monta es un componente del comportamiento reproductivo adquirido por aprendizaje por lo cual puede ser fuertemente influenciado por el sistema de crianza. Los sementales criados de manera conjunta con otros machos adultos pueden presentar alteraciones en el comportamiento sexual, presentando en ocasiones homosexualidad. Los machos jóvenes, a menudo manifiestan impulsos de comportamiento sexual durante sus juegos, el más común es el impulso de montar. Este impulso no es exclusivo de los sementales, ya que las hembras y machos castrados también lo manifiestan. Sin embargo, en los machos este impulso se desarrolla hasta el punto en que se coordina la monta con la eyaculación, bajo la influencia del sistema nervioso y endocrino (Chenoweth, 1983).

2.3.1. Libido y capacidad de servicio

La libido es la capacidad del toro de localizar e intentar servir hembras en estro, mientras que la capacidad de servicio es la capacidad del toro para completar el servicio. Sin embargo, los toros más fértiles no siempre exhiben libido aceptable y viceversa. Los toros jóvenes pueden exhibir una libido adecuada, pero pueden ser incapaces de completar el servicio (Mickelsen, 1990). Para ser clasificado como reproductor potencial satisfactorio se requiere un examen físico satisfactorio y valores mínimos para la circunferencia escrotal, movilidad y morfología. Cualquier toro que no cumpla con estos mínimos debe ser clasificado como reproductor potencial insatisfactorio o su clasificación puede ser aplazada a discreción del evaluador (Madrid-Bury *et al.*, 1994).

Cuando el toro detecta la hembra en celo, se aproxima a ella, con el pene en erección, monta sostenido por sus miembros posteriores y con los miembros anteriores abraza el tren posterior

de la hembra impidiendo sus movimientos. Con el pene realiza movimientos de búsqueda en la proximidad de la vulva y mediante una serie de movimientos pélvico detecta la humedad y calor vulvar, el acto culmina con la penetración y posterior al golpe de riñón. Luego el toro desmonta y queda en relajación o periodo refractario. Para evaluar el comportamiento sexual hay varias técnicas, las más destacables son la evaluación de la Libido, descrita por Chenoweth (1990) y la evaluación de la Capacidad de Servicio descrita por Blockey (1981).

La evaluación de la libido consta de los siguientes puntos: en un pequeño corral 2 hembras son sujetas en cepos distanciados 5-7 metros, los toros deben observar la monta de otros por diez minutos para que se estimulen y se prueban 2 toros y se observan durante 10 minutos.

Para su evaluación se utiliza la siguiente escala de puntaje:

- 0.- El toro no muestra interés sexual.
- 1.- Demuestra interés sexual sólo una vez.
- 2.- Interés sexual más de una vez.
- 3.- Búsqueda activa con persistente interés sexual.
- 4.- Una monta o intento de monta sin servicio.
- 5.- Dos montas o intentos de monta sin servicio.
- 6.- Más de 2 montas o intentos de monta sin servicio.
- 7.- Un servicio seguido de interés sexual.
- 8.- Un servicio de interés con montas o intentos.
- 9.- Dos servicios seguidos de interés sexual.
- 10.- Dos o más servicios seguidos por interés sexual con montas o intentos de monta.

Cada toro es evaluado dos veces en días distintos y el resultado peor se descarta.

La prueba de Capacidad de Servicio (CS), desarrollada por Blockey en Australia permite realizar una evaluación del toro que se corresponde con el comportamiento de la especie, permitiendo clasificar los toros y seleccionar aquellos superiores a la media de la población. La CS se define como la cantidad de servicios que un toro realiza en un periodo de entore a campo de 21 días y es predicho en más de un 90 % de exactitud por el número de servicios que completa en una prueba estandarizada a corral durante 20 minutos.

Agrandes rasgos la evaluación de CS consta de los siguientes puntos:

- Se sujetan 4-6 hembras (no en celo) en cepos individuales distanciados 4.5 metros. El tamaño de la hembra debe ser aproximadamente un 70 % menor al de los toros a probar, si hay desproporción de tamaño hembra-macho la prueba arrojará resultados falsos o el súcubo se agotará rápidamente. Se utiliza una relación toro/hembra de 2/1-1/1.
- Los toros deben observar la monta de otros por lo menos 10 minutos para que se estimulen. A partir de su primer servicio cada toro se deja durante 20 minutos y se cuentan los servicios (no montas) que realiza.

Según la cantidad de servicios que el toro completa se clasifica en Baja CS (0-1), Media (2-3), Alta (4-6) y muy alta (+ de 7). En toros vírgenes se debe realizar una prueba, ya que muchos, por su inexperiencia sexual son clasificados de baja CS.

2.4. Exámenes de órganos sexuales externos

2.4.1. Examen del escroto

El escroto y su contenido se observan y se palpan exhaustivamente desde atrás con el toro bien sujeto para evitar accidentes, hay que presentar atención a eventuales asimetrías, al desplazamiento de testículos y a la superficie de la piel y pelos del escroto. Se mide la circunferencia escrotal ya que existe una correlación positiva entre la circunferencia escrotal y la producción de espermatozoides (Spitzer, 2000).

El escroto con todas sus capas, músculos y revestimientos, le dan soporte y protección a los testículos, además de que contribuyen para mantener una temperatura menor a la corporal, lo que se requiere para mantener una espermatogénesis activa. En el toro se ha encontrado variación entre la diferencia de temperatura corporal y la testicular (cuadro 2) dependiendo esto de la temperatura ambiente (Salisbury *et al.*, 1978).

Cuadro 2. Diferencia entre temperatura corporal y testicular del toro.

Especie	Escrotal subcutáneo °C	Intra-testicular °C	Intra-epididimal °C
<i>Bos indicus</i>	33.7 ± 0.8	33.8 ± 0.7	34.6 ± 0.8
<i>B. indicus X B. taurus</i>	33.3 ± 1.0	32.8 ± 1.6	34.4 ± 1.0
<i>Bos taurus</i>	34.8 ± 1.0	33.9 ± 1.0	35.6 ± 0.6

Brito *et al.* (2004)

2.4.2. Examen de testículos

En los machos los testículos son los órganos genitales de mayor importancia porque es el sitio donde se originan los espermatozoides. En ellos se produce la testosterona, importante para la espermatogénesis, comportamiento sexual, crecimiento genital y corporal. El testículo es de forma ovoide, turgente y elástico. Cuando el testículo presenta una consistencia dura o fibrótica indica que existieron procesos inflamatorios, mientras que una consistencia muy blanda señala una alteración en el curso de la espermatogénesis. Los testículos varían en cierto modo respecto a tamaño, consistencia, desplazabilidad, aumento de temperatura, sensibilidad a la presión, forma y situación, aunque su estructura fundamental es la misma. Se les examina por inspección y palpación para esto se rodea la base del saco escrotal desde atrás con una mano y luego con la otra se hace presión con los pulgares se desplaza el testículo hacia abajo hasta que el escroto esté tenso y sin pliegues (Morillo *et al.*, 2012).

2.4.3. Examen de epidídimo

Es la estructura que le sigue a los conductos eferentes, en la parte dorsal del testículo y para su mejor comprensión se divide en 3 proporciones: cabeza, cuerpo y cola del epidídimo (Salisbury *et al.*, 1978). El examen por inspección y palpación de los epidídimos que sirven para el transporte y maduración de los espermatozoides, se realiza también tomando manualmente un testículo deslizando hacia arriba y palpando el epidídimo que se desplaza a lo largo del testículo por la parte medial del mismo, por motivos prácticos se examina la cabeza, cuerpo y cola comparativamente entre ambos lados y luego en conjunto ya que forma una unidad funcional (Gazitúa, 2004).

2.4.4. Examen de pene y prepucio

El pene es el órgano copulador del macho y se debe realizar una evaluación anatómica y funcional, en la evaluación anatómica se debe identificar heridas, traumas, adherencias o inflamaciones. En la funcional se deberá presentar atención a los mecanismos de exteriorización, erección y reintroducción del pene, mucosa y patologías. Se han señalado algunas anormalidades en el pene que son motivo de descalificación, como hipoplasia del glande, duplicación parcial o total del pene, ausencia total de la flexura sigmoidea, persistencia del frenillo. El miembro envainado de tamaño normal tiene su punta en la mitad del trayecto prepucial entre el orificio del prepucio y el cuello del escroto su grosor es de 3 a 7 cm y mide alrededor de 75 – 100 cm. Y aun en estado flácido tiene una consistencia tensa, firme-elástica. La mucosa normal es húmeda, brillante, rosado pálido hasta rosado rojo.

El prepucio se examina en el momento en que se realiza la evaluación del pene; debe ser siempre observado para descartar la presencia de adherencias, heridas o hematomas, aumento de tamaño, deformaciones y secreciones. La mucosa en caso de prolapso prepucial y la evaluación del orificio prepucial se realiza introduciendo tres dedos para descartar estenosis, fimosis y otras lesiones. Los toros *Bos indicus* (cebú y cruza) son más propensos a sufrir lesiones, debido a que tienen un prepucio muy penduloso (Morillo *et al.*, 2012).

2.4.5. Circunferencia escrotal

La evaluación de la CE es una de las herramientas más valiosa para estudiar la fertilidad potencial del toro, debido a su alta correlación con la producción espermática y la calidad seminal y por la simplicidad de ejecución (Neely *et al.*, 1982).

Se ha demostrado una alta correlación entre el peso de los testículos y la circunferencia escrotal (CE), así como entre el peso de los testículos y la producción de espermatozoides, igualmente entre la circunferencia escrotal y la calidad de eyaculado. El tamaño testicular o la cantidad de tejido productor de espermatozoides se estima a través de la medida de la CE, que es un parámetro sencillo y muy fácil de determinar, utilizando una cinta métrica especial (Madrid-Bury, 2011). En el cuadro 3 se presentan los promedios de la circunferencia escrotal de los toros, de acuerdo a la edad en meses.

Cuadro 3. Promedio de la circunferencia escrotal en toros, de acuerdo a los rangos de edad.

Edad (meses)	(cm)
≤ 15	30
>15 > 18	31
> 18 > 21	32
> 21 > 24	33
> 24	34

Spitzer (2000)

2.5. Factores que afectan la calidad seminal

Según Barth *et al.* (2000), en el proceso de evaluación de la calidad seminal de un toro, es un proceso de evaluación que puede verse afectado por procesos directos, que evidencian alteraciones en la espermatogénesis o por defectos del manejo del semen.

2.5.1. La temperatura

Es uno de los factores ambientales más importantes que modifican la espermatogénesis. Echeverri (2003) cita que la temperatura corporal puede verse afectada por periodos de temperatura ambiental alta al igual que extremadamente bajas o por cuadros de pirexia ocasionado por enfermedades y/o heridas.

Spitzer (2000) argumenta que el mecanismo de daño por temperatura, es la hipoxia testicular, esto se debe a que los testículos operan normalmente en un punto muy cercano a la hipoxia y al ser activados los mecanismos de pérdida de calor, hay vasodilatación dilatación y aumento de la actividad metabólica con una necesidad directa de incrementar el oxígeno, este incremento de oxígeno es una tasa mayor que la del flujo sanguíneo por tanto los testículos se tornan hipóxicos.

2.5.2. El estrés

Aun cuando se tienen diferentes interpretaciones de estrés Echeverri (2003) lo define como aquel estado generado por toda situación interna o externa que perturbe el equilibrio físico y aún social del animal, creando tensión y tendiendo a colocar los mecanismos de defensas del mismo en un estado de alerta y actividad que le permitan responder ante situaciones adversas.

El organismo responde, según la citan Berdugo *et al.* (1994) mediante la producción excesiva de cortisol por parte de las glándulas adrenales lo cual reduce la producción de LH por la pituitaria. Lo que conduce a una disminución en la producción de testosterona por las células de Leydig.

2.5.3. Frecuencia de colecta

La frecuencia de la colecta entra en el contexto del manejo del macho. El ritmo de la colecta se elige de una manera que evite el estrés al animal, ya que éste tiene un efecto negativo sobre el comportamiento sexual. Varios autores han encontrado un descenso tanto del volumen como de la concentración cuando el ritmo de colecta es elevado (Malo *et al.*, 2004).

2.5.4. Nutricionales

La nutrición, tiene mayor impacto sobre las funciones endocrinas más que las espermatogénicas. Así lo reportan Chacón *et al.* (2002). Debido a que el estrés nutricional provoca retardo en el crecimiento de los testículos y supresión de la actividad endocrina lo

que conduce a tener un mayor impacto en animales jóvenes en crecimiento ya que retarda la pubertad y deprime la producción y características del semen.

Barth *et al.* (2000) citan, que los factores nutricionales más comunes que afectan la calidad seminal incluyen la obesidad y sobrealimentación, las diferencias calóricas (raciones bajas en energía disminuyen la libido y la producción de testosterona), proteínicas (especialmente en machos jóvenes), vitaminas y de minerales (deficiencias de yodo, cobre, cobalto, zinc y magnesio afectan la producción de semen y la fertilidad, igualmente es causa de baja de libido) y agentes tóxicos (los estrógenos vegetales, además las tierras raras y radiaciones ionizantes).

2.5.5. Condición corporal

Algunos autores han encontrado una correlación genética negativa entre el peso del animal y la calidad de semen, mientras que la correlación entre el peso y el volumen es positiva (Knights *et al.*, 1984).

2.5.6. La edad

La producción de espermatozoides está asociada en forma directa con la pubertad. Berdugo *et al.* (1994), sostienen que la edad de pubertad depende de variaciones propias que hay entre las razas de leche y carne. Así se explica en general que las razas de tamaño adulto grande con altas ganancias de peso que las razas de tamaño adulto menor que poseen menores ganancias. Y que las razas históricamente seleccionadas por su producción de leche, tienen un comienzo de la pubertad más temprano y un mayor desarrollo testicular a menor edad y madurez que las razas que producen poca cantidad de leche. Además, para el caso de razas de doble músculo poseen un comienzo de la pubertad más lento y poseen un tamaño testicular más pequeño a la pubertad y a la madurez.

2.6. Manejo sanitario

Se estima que entre un 15 a 20 % del total de la producción de las explotaciones ganaderas se pierden debido a causas infecciosas. Para la realización de controles y prevención de las enfermedades es prioritario poder determinar qué factores influyen en ellas, su modo de difusión y entrada. Los organismos infecciosos son muy diversos y van desde virus, bacterias, parásitos y hongos.

2.6.1. Sanidad

La sanidad del toro juega un papel muy importante, dado que un toro reproductor en un hato sirve 25 o más hembras y las expone como transmisor o difusor de enfermedades venéreas e infectocontagiosas, por tal motivo es importante la revisión sanitaria antes de ser puestos en servicio. La revisión sanitaria se debe realizar 3 a 4 meses antes del comienzo de los servicios. Se colectan muestras de sangre y de material prepucial que se envía en condiciones apropiadas a diagnóstico habilitados para que se investigue la presencia de tricomoniasis, campylobacteriosis y anticuerpos contra enfermedades abortivas (brucelosis, leptospirosis, IBR, BVD y leucosis), Además se debe realizar el diagnóstico de tuberculosis (Palacios, 2005).

2.6.2. Gestión de salud

Anzola *et al.* (2007), indican que el semen tiene un gran potencial para la propagación de enfermedades infecciosas examen general de un toro del diagnóstico de la infertilidad. Por lo tanto es necesario, historial del animal, examen general y examen detallado de la zona genital. También deben ser vacunados y llevar un calendario contra las principales enfermedades infecciosas anualmente.

2.7. Semen

Es la suspensión celular líquida que contienen los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios sexuales del aparato reproductor masculino y se mezclan en el momento de la eyaculación (Knobil y Neil, 2003).

2.7.1. Definición de espermatozoide

Son los gametos masculinos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Son células alargadas consistentes con cabeza aplanada portadora de núcleo y una cola que es el aparato necesario para la motilidad celular (Knobil y Neil, 2003).

2.7.2. Morfología del espermatozoide

Cabeza. La característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval que contiene cromatina muy compactada. La cromatina consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (DNA) y proteínas especiales llamadas protaminas espermáticas. Su número cromosómico y el contenido de DNA nuclear es haploide (Hafez y Hafez, 2000).

Acrosoma. Delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo y que establece en las últimas etapas de la formación del espermatozoide. Esta estructura en forma de casquete, que contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas participan en el proceso de la fecundación. Este recubre el extremo anterior del núcleo espermático (Knobil y Neil, 2003).

Cola. Formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo (Hafez y Hafez, 2000).

La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola comprende el axonema. El axonema se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. El segmento medio está en disposición de nueve más dos de los microtúbulos está rodeado por 9 fibras gruesas o densas que al parecer están relacionadas con los nueve dobletes del axonema. El axonema y las fibras asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un padrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática (Hafez y Hafez, 2000).

2.8. Colección de semen con vagina artificial (VA)

Es el método de elección en el bovino, ya que el eyaculado obtenido es normal y representativo del toro en ese momento.

La vagina artificial consta de un tubo rígido de hule, con una válvula exterior, por el lumen del tubo se introduce una manga de látex, la que se dobla sobre los extremos del tubo creando así una cámara de aire. Después, un cono látex con un tubo de centrífuga graduado se fija a uno de los extremos y al tubo de hule y se le introduce agua caliente; para efectuar la colección de semen, los toros requieren que la vagina artificial tenga una temperatura entre 22 a 50 °C. Para la monta se utiliza un señuelo que puede ser una vaca, un macho o un maniquí. Antes de colectar el semen se debe de tener en cuenta 2 aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental (Galina y Valencia, 2006).

Antes de la monta se deberá lavar con agua y secar perfectamente el vientre y la zona del prepucio; el mechón de pelos del orificio prepucial estará limpio y los pelos se recortarán a una longitud de 2cm.

El método más efectivo para estimular al toro es la monta falsa, que consiste en permitir al semental montar sobre el señuelo y desviar el pene tomando con la palma de la mano la piel del prepucio sin ofrecerle la vagina. Después de algunos segundos de intento de búsqueda de la vagina, el animal desciende; nunca se deberá tocar con la mano la mucosa del pene. En el siguiente intento de monta se coloca la punta del pene desviado en la entrada de la vagina; inmediatamente el toro se lanza hacia adelante en un empuje final que acompaña a la eyaculación. La monta falsa en el bovino aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y movilidad (Galina y Valencia, 2006).

2.9. Evaluación macroscópica del semen

2.9.1. Volumen

Se hace para calcular posibles soluciones del semen para su posterior procesamiento y establecer patrones de cada toro, por ejemplo la calidad del semen varía según las especies, el estado fisiológico, individuo, edad, raza, número de saltos, métodos de recolección, factores sanitarios, nutricionales y medio ambiente ocasionan variantes en la cantidad de semen (Hafez y Hafez, 2002) establecieron en bovinos que la eyaculación media es de 4 a 6 centímetros cúbicos de semen, mientras que los adultos pueden eyacular de 10 a 15 cm³, además de la circunferencia escrotal.

2.9.2. Consistencia

Esta es dada por observación subjetiva y se clasifica en cremosa, lechosa-cremosa, lechosa y acuosa, está directamente correlacionada de forma positiva con la concentración espermática, (Hafez y Hafez, 2002).

Creмосa (densísimo 1.5 a 2 x 10 espermatozoides/mm)

Creмосa-lechosa (muy denso 1 a 1.5 x 10 espermatozoides/mm)

Lechosa (denso 0.75 a 1 x 10 espermatozoides/mm)

Semiacuosa (semidenso 0.3 a 0.5 x 10 espermatozoides/mm)

Acuosa (ralo 0.2 x 10 espermatozoides/mm)

2.9.3. Color

Según Barth *et al.* (2000), posee una coloración blanquecina o ligeramente amarillenta y su opacidad se halla en función de la concentración espermática. Los eyaculados muy buenos tienen apariencia granulosa con una concentración de 750 a 1000 millones o más de espermatozoides por mililitro buenos, semen opaco, lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides por mL. Regular, semen con leche aguada con 250 millones de espermatozoides por mL. Normal del blanco al amarillento, patológicos los colores rosado, grisáceo y verdoso (Hafez y Hafez, 2002).

2.9.4. pH

El pH viene dado por las secreciones ácidas provenientes de la próstata y las secreciones alcalinas de las vesículas seminales. La medición del potencial de hidrógeno es realizada mediante un peachímetro o bien con cintas tornasol en una pequeña muestra de semen. El semen bovino tiene un pH que fluctúa entre 6.4 a 7.8 si excede se puede sospechar de algún tipo de infección y probablemente en ese caso disminuya la secreción de productos ácidos de la próstata, tales como el ácido cítrico. Se pueden medir valores de pH anormales en el caso de eyaculación incompleta (Hafez y Hafez, 2002).

2.10. Evaluaciones microscópicas del semen

Para evitar las alteraciones técnicas por choque de frío, al momento de evaluar la muestra microscópicamente, deben mantenerse las láminas (porta y cubre objetos) a una temperatura de 37 °C, sobre las cuales se colocan las muestras con el fin de evitar que se afecte la observación (Barth *et al.*, 2000).

2.10.1. Movilidad masal

Se coloca una gota de semen de 5 mm de diámetro sobre un portaobjetos precalentando, y se observa el movimiento en masa de los espermatozoides usando microscopía de campo claro, el diafragma de campo cerrado y con magnificación de 40X. Los factores que influyen en el movimiento en masa de los espermatozoides son la concentración, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad/vigor del movimiento de los espermatozoides. Si uno o más de estos factores se encuentran comprometidos, el movimiento en masa se reducirá (Baracaldo *et al.*, 2007). En el cuadro 4 se presentan las 4 frecuencias para evaluar la movilidad masal del semen de los toros.

Cuadro 4. Clasificación de la movilidad masal del semen.

Categorías	Movimiento	(%)
1.- Muy bueno	Remolinos rápidos	70 – 100
2.- Bueno	Remolinos lentos	50 – 69
3.- Regular	Remolinos apenas apreciable	30 – 49
4.- Pobre	Sin movimiento	< 30

Baracaldo *et al.* (2007)

2.10.2. Movilidad individual

Se coloca un volumen de 5 a 7 μL de semen sobre un portaobjetos nuevo y precalentado creando una gota de aproximadamente 3 a 5 mm de diámetro, que luego se cubre con una laminilla cubreobjetos. La muestra es observada con microscopía de contraste de fase y con aumento de 200 - 400X, determinando el porcentaje de células espermáticas con movimiento progresivo lineal. Si el semen está muy concentrado, la muestra puede diluirse con una solución amortiguadora o diluyente de semen antes de colocar el cubreobjetos (Baracaldo *et al.*, 2007). En el cuadro 5 se presentan las 4 categorías para evaluar la movilidad individual progresiva del semen de los toros.

Cuadro 5. Clasificación de la movilidad individual del semen.

Categorías	Movimiento (%)
Muy bueno	80 – 100 con movilidad progresiva
Bueno	60 – 79 con movilidad progresiva
Regular	40 – 59 con movilidad progresiva
Pobre	< 40 con movilidad progresiva

Baracaldo *et al.* (2007)

2.10.3. Concentración espermática

Se determina por la técnica de recuento directo; se realiza una solución de 1:200, para lo cual se toma semen hasta la marca de 0.5 μL de la pipeta de Thoma y luego se toma citrato de formalina hasta la marca de 101 μL ; después, la muestra se agita para combinar el semen y el citrato de formalina, se desechan las primeras 3 gotas de la pipeta; posteriormente se llena una cámara de newbauer (hemocitómetro) colocando la pipeta en la hendidura entre la cámara de newbauer y un cubreobjeto, esta se llena por la capilaridad; para el conteo se toman en cuenta 5 cuadrículas (las 4 de las esquinas y el centro), se cuentan los

espermatozoides en cada cuadrícula y los que estén sobre la línea marginal superior e izquierda (Hafez y Hafez, 2002). Y se utiliza el microscopio a objetivo 40X.

2.10.4. Morfología espermática

La morfología espermática indica el porcentaje de espermatozoides capaces de fecundar un óvulo. Las anomalías que se pueden encontrar en los espermatozoides pueden ser primarias o secundarias. Las anomalías primarias tienen su origen durante la espermatogénesis, esta a su vez se dividen en específicas e inespecíficas. Las específicas son provocadas por alteraciones en el código genético y van a estar presentes en proporciones similares durante toda la vida reproductiva del semental, mientras que las inespecíficas son ocasionadas por factores climáticos, nutricionales, traumáticos o infecciosos. Las alteraciones morfológicas secundarias tienen su origen durante la eyaculación, manipulación y evaluación del semen y no representan problemas de importancia (Hafez y Hafez, 2002).

Frotis.- para completar la evaluación, se deben realizar los siguientes frotis: coloración vital, morfología y acrosomía, pudiéndose evaluar estos dos últimos en el mismo frotis, con la tinción adecuada. Para observar la cantidad de espermatozoides vivos y las anomalías, generalmente se mezcla el semen con colorantes y se realiza una frotis fino y se deja secar. Se observan al microscopio con objetivo de 40X, en general se considera que un buen reproductor no debe tener más del 30% de anomalías espermáticas; y se determina el porcentaje de espermatozoides coloreados (muertos) y no coloreados (vivos). Por lo común se cuentan 200 espermatozoides en varios campos y se anotan los alterados y el tipo de alteración (Baracaldo *et al.*, 2007). En el cuadro 6 se presentan las 4 categorías para evaluar la morfología espermática y espermatozoides vivos del semen de los toros.

Cuadro 6. Clasificación de la morfología espermática y frotis de vivos y muertos del semen.

Categorías	Morfología de espermatozoides normales y vivos (%)
Muy bueno	80 – 100
Bueno	60 – 79
Regular	40 – 59
Pobre	< 40

Modificado de Baracaldo *et al.* (2007)

2.11. Método para calcular la concentración espermática

2.11.1. Método manual (Cámara de Newbauer)

El área que se cuenta es de 1 mm. El cubreobjetos está 0.1 mm arriba del piso de la cámara. Por lo tanto el volumen que se está contando es de 0.1 mm^3 o $0.1 \text{ }\mu\text{L}$. Entonces se multiplica el promedio de las 2 cámaras por 10,000 para obtener la concentración por ml de la muestra diluida. O sea que para calcular la concentración del eyaculado original: se saca el promedio de las 2 cámaras, multiplicando por 10,000 y después multiplicar por el factor de dilución.

El recuento se realiza con la cámara de Newbauer contando las cabezas de los espermatozoides (EPZ) y observados en 5 cuadros tomados (4 de las esquinas y el centro), y se aplica la siguiente formula (Baracaldo *et al.*, 2007):

$$CE= N \times F \times D$$

CE= concentración espermatozoides;

N= Número de espermatozoides contados en los 5 cuadrantes;

F= Factor de multiplicación: $1/50 \text{ mm}^3$ y

D= Factor de dilución: $1/200$.

2.12. Proceso zoonosario del semen de animales domésticos

Es una función de la Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural es fomentar la producción pecuaria y por lo cual prevenir, controlar y erradicar las plagas y enfermedades que afectan a la ganadería nacional tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos. Que a través de la inseminación artificial se pueden transmitir la leptospirosis, campilobacteriosis, rinotraqueitis viral bovina, tricomoniasis, diarrea viral bovina, brucelosis enfermedad del ojo azul, parvovirus y enfermedad de Aujeszky.

Dentro del marco de la producción pecuaria, la actividad de comerciar local, nacional e internacionalmente semen obtenido del ganado domestico de alta calidad genética, ocupan un lugar preminente y por lo mismo su manejo en condiciones zoonosarias inadecuadas, constituyen un riesgo para la salud de los animales (NOM-027-ZOO, 1995).

2.12.1. Definiciones y abreviaturas

Para efectos de esta norma, se entiende por:

- Área de aislamiento.- local destinado a la evaluación sanitaria de los animales, previamente a su ingreso al GAPROSEM o CEPROSEM.

- Área de proceso.- local donde se realizaran las actividades de evaluación, extensión, envase, congelación del semen, preparación del diluyente, esterilización del equipo y utensilios.
- Área de obtención.- lugar donde se colecta el semen.
- CEPROSEM: Centro de Procesamiento de Semen que se integra por el laboratorio y alojamiento de animales en la misma área, que opera bajo las especificaciones de esta Norma.
- GAPROSEM: Explotación pecuaria que se dedica a la obtención de semen de los animales alojados en sus instalaciones y que opera bajo las especificaciones de esta Norma.
- Hoja clínica.- Formato en el que se asientan los datos sobre enfermedades o padecimientos de los animales, tratamientos a que fueron sometidos y pruebas realizadas.
- Laboratorio aprobado.- Laboratorio que hace las pruebas zoonosanitarias descritas en esta Norma, “LAPROSEM”.
- Libro de control de eyaculados.- Archivo en el que se registran los siguientes datos: cada uno de los eyaculados del semental, fecha de obtención y el volumen obtenido.
- Libro de control de semen procesado.- Archivo en el que se registran los siguientes datos: semental del que se origina el eyaculado, fecha de su obtención y dosis resultantes después del proceso.
- Libro del control sanitario.- Archivo en el que se registran los siguientes datos: nombre del semental, identificación del semental, número de registro interno del semental GAPROSEM o CEPROSEM y pruebas realizadas de acuerdo a los Apéndices Normativos por especie.
- Médico veterinario.- Profesionista con cédula expedida por la Dirección General de Profesiones de la Secretaría de Educación Pública de Médico Veterinario.
- Oficina de registros.- Área destinada para la conservación de los libros de control.
- Residencia.- Espacio físico en donde residen los sementales y señuelos.
- Secretaria.- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- Semen procesado.- Dosis de semen que se encuentra en contenedores debidamente identificado y que cumplió con los requisitos de la calidad zoonosanitaria.
- Semental CEPROSEM o GAPROSEM.- Animal destinado a la obtención de semen.

- Vado sanitario.- Lugar donde se hace pasar a los vehículos y personas para desinfección antes del ingreso al CEPROSEM y GAPROSEM.
- Los propietarios de CEPROSEM, GAPROSEM y LAPROSEM, deben dar aviso de inicio de funcionamientos a la secretaria, proporcionando su nombre y domicilio.

2.12.2. Especificaciones

Independientemente del número de sementales y de la capacidad de producción, procesamiento y venta, los CEPROSEM, GAPROSEM y LAPROSEM, deben cumplir con los siguientes requisitos; de la localización, construcciones e instalaciones:

- CEPROSEM y GAPROSEM.- Estarán ubicados de tal forma que queden separados de otros tipos de explotación pecuaria, otros animales no destinados al uso específico que señala esta Norma o centros de sacrificio.
- LAPROSEM.- Estarán ubicados fuera de cualquier tipo de explotación pecuaria o centros de sacrificio.
- CEPROSEM.- Contarán con construcciones hechas a base de materiales permanentes y con recubrimientos que permitan una adecuada limpieza y desinfección, que serán destinadas al uso específico que señala esta Norma.

Los CEPROSEM deben contar al menos con las siguientes instalaciones:

- Área de aislamiento.- Debe estar debidamente delimitada, cumplir con las especificaciones del área de residencia y estar separada de la misma.
- Área de laboratorio.- Local cerrado con presión positiva dotado de una ventanilla para la recepción del semen.
- Área de obtención del semen.- Esta área debe estar comunicada con la residencia de sementales y debe contar con espacio para sujeción de semovientes, espacio para manejo del semental y áreas de protección para el personal.
- Área de registros.- Espacio cerrado de acceso restringido.
- Residencia de sementales.- Área delimitada con instalaciones que permitan el control de la entrada y salida de sementales, debe contar con drenaje que evite el encharcamiento y acumulación de líquidos.
- Vado sanitario.- Debe estar ubicado en la entrada del área restringida, debiendo tener las medidas necesarias para su función. Debe resistir el llenado permanente con alguna solución desinfectante.

Los GAPROSEM deben contar al menos con las siguientes instalaciones:

- Área de aislamiento.- Debe estar debidamente delimitada, cumplir con las especificaciones del área de residencia y estar separada de la misma.
- Área de obtención del semen.- Esta área debe estar comunicada con la residencia de sementales y debe contar con espacio para sujeción de semovientes, espacio para manejo del semental y áreas de protección para el personal.
- Residencia de sementales.- Área delimitada con instalaciones que permitan el control de la entrada y salida de sementales, que debe contar con drenaje que evite el encharcamiento y acumulación de líquidos.
- Vado sanitario.- Debe estar ubicado en la entrada del área restringida, debiendo tener las medidas necesarias para su función. Deberá resistir el llenado permanente con alguna solución desinfectante.

Los LAPROSEM deben contar al menos con las siguientes áreas o construcciones:

- Área de laboratorio.- Local cerrado con presión positiva dotado de una ventanilla para la recepción del semen.
- Oficina de registros.- Espacio cerrado de acceso restringido.

De los animales:

- A los animales nacionales o importados que se destinen a la obtención de semen, se les aplicará lo señalado en los Apéndices Normativos por especie.
- Para el reingreso de cualquier semental que haya salido del CEPROSEM y GAPROSEM, se debe cumplir con lo señalado en los Apéndices Normativos por especie.
- Cualquier animal que enferme o muestre algún tipo de padecimiento, será aislado en un lugar ubicado dentro del CEPROSEM o GAPROSEM para su valoración médica y tratamiento y consecuentemente para su reincorporación o desecho, debiendo anotarse en la hoja clínica del animal, las prácticas médicas realizadas y el registro del posible impacto sanitario, tanto en los otros animales como en el semen.
- Los únicos animales que deben estar en los CEPROSEM y GAPROSEM, destinados a la extracción del semen, serán aquellos que cumplieron con los requisitos señalados en esta Norma y deben ser identificados y registrados en el libro de control sanitario de los donadores.

- Los animales utilizados como señuelos, deben cumplir con los requisitos señalados en esta Norma para los animales destinados a la extracción de semen.

De la obtención del semen:

- Para obtener semen de un semental en el CEPROSEM, el laboratorio deberá constatar la existencia de los comprobantes de las pruebas de laboratorio vigentes, practicadas a los sementales de acuerdo a lo indicado en el inciso de permanencia en el área de residencia de los Apéndices Normativos por especie, así como identificar y registrar la colección de semen.

Para obtener semen de un semental, el LAPROSEM requerirá: Identificación del CEPROSEM o GAPROSEM de procedencia, certificado zoonosanitario, comprobantes de las pruebas de laboratorio vigentes, practicadas a los sementales de acuerdo a lo indicado en el inciso de permanencia en el área de residencia de los Apéndices Normativos por especie, así como identificar y registrar la colección del semen.

- Cada vez que se colecte semen de un semental GAPROSEM, su propietario bajo protesta de decir verdad, declarará ante el LAPROSEM en los formatos que provea la Secretaría, que el semental del que se obtendrá semen, no ha tenido contacto físico con otros animales, exceptuando otros sementales GAPROSEM o señuelos del mismo hato; asimismo que no ha tenido contacto sexual con hembras y no ha padecido ninguna enfermedad infecciosa, en los últimos 60 días o desde la última colección de semen.
- Cada vez que el semental sea trabajado, debe asentarse la información correspondiente en el libro de control de eyaculados.
- El equipo y materiales que tengan contacto con el semen durante su extracción y proceso debe esterilizarse y manejarse debidamente protegidos.
- El semen obtenido debe tratarse con antibióticos de acuerdo a los tipos y cantidades descritas en el Apéndice Normativo por especie.

De la identificación del semen procesado:

- Se debe llevar un libro de control del semen procesado, en el que conste el estado sanitario del donador en el momento de la recolección.
- Independientemente de su presentación, el envase de cada dosis de semen, debe ser marcado al menos con la siguiente información: Clave del CEPROSEM o GAPROSEM, Fecha de recolección.

Del personal técnico.- Los CEPROSEM, GAPROSEM y LAPROSEM deben contar con un Médico Veterinario.

2.12.3. Método de prueba y muestreo

- El cumplimiento de las especificaciones de esta Norma, será verificado por la Secretaría, de forma aleatoria y por las Unidades de Verificación aprobadas. Es motivo de verificación, la condición sanitaria de los sementales, la obtención del semen, el proceso del semen en el laboratorio y la identificación del semen procesado.
- Se realizará una verificación aleatoria de los CEPROSEM y LAPROSEM, para constatar en el laboratorio la utilización de antibiótico en el semen, el tipo de antibiótico y la cantidad empleada.
- Se realizará un muestreo aleatorio de las dosis de semen procesadas en sus diversas presentaciones y se verificará la identificación de su envase.
- Se seleccionará de manera aleatoria a los animales utilizados para la obtención de semen y a los señuelos y se verificará su expediente sanitario.

2.12.4. Importaciones

El semen importado debe reunir al menos condiciones de proceso zoonosanitario similares a las especificadas en esta Norma o consideradas por la Secretaría como equivalentes.

2.13. Especie bovina

- Ingreso al área de aislamiento.- Previamente a su ingreso a un CEPROSEM o GAPROSEM, los bovinos deben permanecer en el área de aislamiento durante un periodo de 30 días y ser sometidos a un examen clínico general por un Médico Veterinario, para que se practiquen las siguientes pruebas diagnósticas en un laboratorio aprobado. Leptospirosis, Campilobacteriosis, Rinotraqueitis Viral Bovina*, Tricomoniasis y Diarrea Viral Bovina*. *Por ningún motivo podrán ingresar al CEPROSEM o GAPROSEM el o los animales que resulten positivos.
- Ingreso al área de residencia del CEPROSEM o GAPROSEM.- Para ser admitidos en el área de residencia, los bovinos deben cumplir con: Estancia de 30 días en el área de aislamiento, Prueba negativa a Diarrea Viral Bovina y Rinotraqueitis Viral Bovina, realizadas durante el aislamiento, Pruebas negativas a Tricomoniasis, Leptospirosis y Campilobacteriosis realizadas durante el aislamiento y no estar en contacto con otros animales durante el traslado del área de aislamiento al área de residencia.

- Permanencia en el área de residencia del CEPROSEM o GAPROSEM.- Obtener pruebas negativas a Leptospirosis, Tricomoniasis, Campilobacteriosis, Rinotraqueitis Viral Bovina y Diarrea Viral Bovina cada seis meses en el caso del CEPROSEM y cada tres meses, en el caso de GAPROSEM.

2.13.1. Colección de semen

Prepucio.- En el momento de la recolección del semen, el prepucio del toro debe estar limpio y con los pelos prepuciales recortados. En el caso de prepucios anormales, muy largos, anormalidades en la cavidad prepucial que facilite la invasión de microorganismos o cuando la eyaculación sea mediante electroeyaculador, la cavidad prepucial se lavará con solución salina isotónica antes de la eyaculación. Los señuelos deben estar bien limpios y cubiertos por una anquera, para evitar el contacto del pene del semental con el cuerpo y sobre todo con los órganos genitales del señuelo.

2.13.2. Manejo durante la colección de semen

La persona que realice la recolección deberá portar guantes del tipo desechable, utilizando un guante nuevo para cada recolección. La vagina artificial debe ser previamente esterilizada y se usará una para cada colección o intento de colección del semen. El lubricante de la vagina debe de ser estéril y neutro.

2.13.3. Manejo del semen en el CEPROSEM y LAPROSEM

Por cada mililitro de dilución final del semen, debe agregarse la siguiente cantidad de antibióticos.

Espectomicina	300 microgramos
Tylosina	50 microgramos
Gentamicina	250 microgramos
Lincomicina	150 microgramos

2.13.4. Medidas de control

Personal.- Para el ingreso a las áreas de aislamiento, residencia y obtención, toda persona deberá despojarse de su ropa de calle, someterse a un baño, así como portar ropa y botas limpias exclusivas para el área de trabajo. Las personas que ingresen al área de aislamiento, deben someterse a lo indicado en el inciso anterior para poder reingresar a la residencia o al área de obtención.

Desinfección.- Cualquier persona o vehículo que ingrese al GAPROSEM o CEPROSEM, deberá desinfectar calzado y llantas respectivamente en el vado sanitario.

III. JUSTIFICACIÓN

3.1. Problema de investigación

Aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del semental CLT a través de expandir su potencialidad de apareamiento con el uso de semen de alta calidad para la inseminación artificial.

La valoración de la calidad del semen, es una de las herramientas de análisis más empleadas en la clasificación de los machos para el servicio de monta directa o programas de inseminación artificial.

Los conocimientos de la calidad del semen de toros CLT son escasos. Se pretende conocer su calidad y poder congelar pajillas de semen.

3.2. Justificación del problema

El problema se define en conocer el comportamiento reproductivo del semental criollo a través de las estaciones del año para contar con disponibilidad de pajillas de inseminación artificial a de manera permanente. Los sementales CLT viven y se reproducen bajo condiciones climáticas adversas.

Este problema se justifica por las siguientes razones:

Se prevé un aumento en la demanda de germoplasma del ganado CLT, tanto en mercados nacionales como internacionales, con especial referencia a dosis de semen para IA de toros con alto valor genético.

Se necesita aumentar el tamaño efectivo de la población CLT en manos de criadores comerciales.

Se requiere tener conectividad genética entre diferentes hatos, lo que se logra de manera más eficiente y rápida con el uso de los mismos toros en los diferentes hatos, a través de la IA.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del área de estudio

El estudio se realizó en el Campus Veracruz del Colegio de Postgraduados, localizado en la comunidad de Tepetates, municipio de Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, a 19° 16' N y 96° 16' O, a una altura de 20 msnm. El clima de la región es $Aw_0(w)(i')gw''$, cálido subhúmedo con lluvias en verano, distribuidas de mayo a octubre, precipitación media anual de 1060 mm y temperatura de 26.4 °C (García, 1988). Se consideraron dos épocas experimentales, una fresca en el mes de enero y otra cálida en el mes de mayo, con temperaturas medias y humedades relativas de 21.9 °C y 21.5 %, y 27.3 °C y 26.8 %, respectivamente.

4.2. Fuente de datos

Se utilizaron 70 muestras de semen provenientes de siete sementales de 25.6±1.68 meses de edad y 319.14±6.24 kg de peso vivo. Sin embargo, de los nueve sementales incluidos originalmente en el estudio, se eliminaron 2 por ineptitud para la monta del maniquí durante el entrenamiento para el uso de la vagina artificial. Debido a que unidades de muestreo homogéneas para la experimentación en bovinos criollos no se encuentran disponibles en números considerables, el tamaño de muestra para experimentación generalmente no es grande. Sin embargo, el uso de mediciones repetidas en las unidades de muestreo permite tener un número suficiente de unidades experimentales y pruebas estadísticas potentes para detectar diferencias entre tratamientos (épocas) a través del tiempo (Littel *et al.*, 1996).

4.3. Manejo de animales y colecta de semen

Durante el periodo experimental de la última semana de noviembre de 2011 a mayo de 2012 los sementales se alojaron en potreros donde la alimentación consistió en pasto Pará (*Brachiaria mutica*) a libertad y alimento comercial con 18 % de P.C., a razón de 4 kg d⁻¹ animal⁻¹ y agua a libertad. Los sementales se manejaron con gamarra y se les sometió a una caminata diaria de 10 minutos, fueron cepillados, desparasitados interna y externamente, se les cortó el bello prepucial y fueron dosificados con un estimulante metabólico a base de fosforo orgánico. En cada época experimental, se colectaron cinco muestras de semen en periodos de 4 días cada una. El semen se colectó en el segundo intento de monta, utilizando una vagina artificial provista de un tubo de policarbonato graduado y un maniquí para monta, se estimuló al semental mediante una primera monta falsa. La monta falsa en el bovino estimula el aumento del volumen de eyaculado, la concentración espermática y la movilidad (Galina y Valencia, 2006).

4.4. Variables de respuesta continuas

Volumen de eyaculado (VE, mL). Se midió directamente del tubo graduado de la vagina artificial. Es útil como medida para el cálculo de soluciones de semen para IA de cada semental.

Concentración espermática (COE, $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$). Se contaron espermatozoides en la Cámara de Neubauer en cinco cuadrantes (esquinas y centro) y en las líneas marginales superior e izquierda de una cuadrícula usando un contador de espermatozoides. Se utilizan 0.5 μL de semen puro de la pipeta de Thoma diluidos en 101 μL solución salina formolada (Hafez y Hafez, 2002). Se utilizó el microscopio a objetivo 40X.

Movilidad individual (MI, %). Se midió observando la movilidad progresiva de los espermatozoides de una gota de semen puro disuelto en una gota de solución de citrato de sodio en portaobjetos atemperado a 35 °C y con un cubre objetos, al atravesar el campo visual del microscopio con el objetivo de 40X. Se identifican 4 categorías de calidad; muy buena de 80 a 100 %, buena de 60 a 79 %, regular de 40 a 59 % y pobre menor de 40 %.

Espermatozoides normales (EN, %). Se contaron espermatozoides normales utilizando el mismo frotis utilizado para medir los espermatozoides vivos.

Espermatozoides vivos (EV, %). Se midió contando el número de espermatozoides vivos y muertos en el campo visual del microscopio. Se mezclaron una gota de semen puro y una gota de tinción eosina-nigrosina homogéneamente y se colocaron en el filo del portaobjeto haciendo un barrido con otro portaobjeto dejando un frotis muy delgado, el cual se seca cerca de la flama. Se hizo la observación al microscopio con el objetivo 40X, los espermatozoides muertos aparecen teñidos de color rosa, los vivos permanecen de color blanco.

Potencial de hidrógeno (pH). Se midió utilizando tiras reactivas de pH, en la cuales se marcan números enteros; un pH entre 6.4 a 7.8 indica una buena calidad del semen (Hafez y Hafez, 2002).

4.5. Variables de respuesta discreta

Movilidad masal (MM). Se midió en 4 categorías; remolinos rápidos, remolinos lentos, sin remolinos y sin movimiento. Se colocó una gota de semen puro en el portaobjetos atemperado a 37 °C. Se observó al microscopio con un objetivo de 10X.

Color (CL). Se midió en 5 categorías; blanco, amarillento, rosado, grisáceo y verdoso, los tres últimos son considerados patológicos.

Consistencia (CS). Se midió en 5 categorías; lechosa cremosa, cremosa clara, lechosa, lechosa cremosa turbia y cremosa acuosa. La consistencia puede indicar la concentración espermática, siendo la más favorable la lechosa cremosa y la menos favorable la cremosa acuosa (Hafez y Hafez, 2002).

La concentración espermática, movilidad individual, espermatozoides normales, espermatozoides vivos y movilidad masal, se observaron utilizando microscopio Zeiss con contraste de fase claro. El color y la consistencia se observaron de manera macroscópica.

4.6. Análisis estadístico

El volumen de eyaculado y las variables microscópicas, concentración espermática, movilidad individual, espermatozoides normales y espermatozoides vivos se analizaron con el siguiente modelo lineal mixto con mediciones repetidas:

$$y_{ijk} = \mu + E_i + M_{j(i)} + S_k + \beta_1(x_{1ijk} - \bar{x}_{1...}) + \beta_2(x_{2ijk} - \bar{x}_{2...}) + \epsilon_{ijk}$$

Donde;

y_{ijk} = Observación de la i-ésima época, j-ésimo periodo de muestreo anidado en la i-ésima época, del k-ésimo semental.

μ = Constante que caracteriza a la población.

E_i = Efecto fijo de la i-ésima época. $i = 1$, fresca; 2 , calurosa.

$M_{j(i)}$ = Efecto fijo del j-ésimo periodo de muestreo de semen anidado en la i-ésima época. $j = 1, 2, \dots, 5$.

S_k = Efecto aleatorio del k-ésimo semental. $k = 1, 2, \dots, 6, 7$. $S_k \sim IIN(0, \sigma_s^2)$.

β_1 = Coeficiente de regresión que relaciona la circunferencia escrotal con la variable de respuesta.

x_{1ijk} = Circunferencia escrotal asociada a la variable de respuesta.

$\bar{x}_{1...}$ = Media de la circunferencia escrotal.

β_2 = Coeficiente de regresión que relaciona la edad con la variable de respuesta.

x_{2ijk} = Edad asociada a la variable de respuesta.

$\bar{x}_{2...}$ = Media de la edad.

ϵ_{ijk} = Error aleatorio. $\epsilon_{ijk} \sim IIN(0, \sigma^2)$.

La covariable circunferencia escrotal (CE) se midió en enero y mayo con una cinta métrica y se usó como referencia la circunferencia mayor, tomando firmemente el cuello del escroto haciendo descender los testículos. Se utilizaron modelos con mediciones repetidas ya que los sementales (unidades de muestreo) no fueron numerosos y requerían entrenamiento especial para el uso de la vagina artificial. Se utilizó una estructura de covarianzas en simetría compuesta. Los datos fueron procesados con el procedimiento MIXED del SAS (SAS Institute, 2010). Para las variables medidas en porcentaje se utilizó la transformación arcoseno, aunque no hubo cambios en la significancia de efectos cuando se utilizaron los datos originales. La movilidad masal y las variables macroscópicas de respuesta discretas color y consistencia, se analizaron con un modelo lineal mixto generalizado, con efectos similares al modelo mencionado, utilizando una distribución multinomial con función de enlace logística para color y consistencia. Los datos fueron procesados con el procedimiento GLIMMIX del SAS. Con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, las frecuencias de respuesta fueron estimadas con el procedimiento FREQ del SAS. Para las variables de respuesta discreta, se hizo una comparación de medias de las características seminales continuas entre las clases observadas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la edad de 25.6 ± 1.68 meses de edad y peso de 319.14 ± 6.24 kg, los sementales CLT tuvieron una CE de 34.2 ± 0.24 cm. La CE de los sementales CLT fue mayor a la estimada de 33.2 ± 0.5 cm en toros Criollo Limonero de 30.6 ± 3.8 meses de edad, sometidos a un clima cálido con temperatura y precipitación medias anuales de 27.4 °C y 920 mm (Madrid-Bury *et al.*, 2011) y de 30.2 ± 0.8 cm de toros mestizos Pardo Suizo x Cebú (Madrid-Bury *et al.*, 1997). Toros mestizos 75 % *Bos indicus* x 25 % *Bos taurus* menores de 30 meses de edad tuvieron una CE de 34.2 cm en invierno y 36.1 cm en verano (Prieto *et al.*, 2007). Excepto al volumen de eyaculado, la CE no afectó significativamente ($p > 0.05$) ninguna de las variables de respuesta, la edad tampoco afectó ($p > 0.05$) ninguna de ellas. La CE media de los sementales CLT estuvo acorde con especificaciones establecidas para diferentes genotipos (Irons *et al.*, 2007). En el Cuadro 7 se presentan las medias estimadas de las variables de respuesta continuas.

Cuadro 7. Características seminales de sementales Criollo Lechero Tropical en dos épocas del año (medias mínimo cuadráticas \pm error estándar).

Época	Volumen de eyaculado (mL)	Concentración espermática ($\times 10^6$ mL ⁻¹)	Movilidad individual (%)	Espermatozoides normales (%)	Espermatozoides vivos (%)
Fresca (Diciembre-Febrero)	4.0 ± 0.4	776.0 ± 77.8	68.3 ± 5.4	76.2 ± 1.5	80.4 ± 3.1
Calurosa (Abril-Junio)	4.1 ± 0.4	1196.6 ± 77.8	75.7 ± 5.4	80.8 ± 1.5	83.4 ± 3.1
	($p > 0.050$)	($p \leq 0.004$)	($p \leq 0.066$)	($p \leq 0.014$)	($p > 0.050$)

Volumen de eyaculado

El VE no fue diferente entre épocas, sin embargo la CE afectó significativamente el VE con $\hat{\beta} = 0.37 \pm 0.17$ ($p \leq 0.03$). A pesar de las diferencias en temperatura media y humedad relativa de las dos épocas, los sementales produjeron un VE similar de 4.04 ± 0.4 mL de semen. Sin embargo, la variabilidad individual entre sementales se manifiesta por los valores mínimo y máximo observados (1.5, 8.0). Las compañías comerciales requieren volúmenes de eyaculados superiores a 6 mL en sementales adultos para IA. Sementales Holstein (n=18) y (n=18) utilizados para IA fueron evaluados durante tres años en Pakistán, en un clima

subtropical con una estación fresca de octubre-marzo y con temperaturas de 30 a 45 °C durante el verano, de abril-junio (seco) a julio-septiembre (húmedo), adverso a razas exóticas de regiones templadas. El VE fue menor en los toros Holstein durante el verano seco y mayor en el Jersey en el verano húmedo; la media de VE fue de 4.05 ± 0.03 y 2.92 ± 0.03 mL, respectivamente (Fiaz *et al.*, 2010). En Venezuela (Valle *et al.*, 2005) en un clima cálido y dos estaciones una seca y otra lluviosa, con temperaturas y humedades relativas medias de 30.3 a 26.8 °C y 62.8 a 85.5 % toros Holstein y Suizo Pardo (n=10) de 24 a 36 meses de edad tuvieron menor VE en la época seca 3.6 ± 1.2 mL que en la húmeda 4.8 ± 2.1 mL. Los sementales CLT a diferencia de los toros europeos no adaptados a climas cálidos tuvieron un VE similar en las dos épocas del año. Lo anterior coincide con el VE medio de 4.5 ± 0.2 mL obtenido con toros Sahiwal de hasta 3 años de edad y a través de las cuatro estaciones del año en Pakistán (Ahmad *et al.*, 2003). En los sementales CLT se estimó una correlación $r = 0.55$ ($p \leq 0.05$) entre el VE y la media de CE, superior a $r = 0.40$ estimada en toros mestizos Pardo Suizo x Cebú (Madrid-Bury *et al.*, 1997).

Concentración espermática

La COE fue diferente entre épocas. La COE media superior a $1100 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ para la época calurosa puede considerarse satisfactoria. Sin embargo, durante la época fresca la COE media no alcanzó los $800 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. El intervalo de COE fue de 170 a $2180 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, con 25 % de las muestras $\geq 1250 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Toros criollos colombianos Costeño Con Cuernos (n=8) y Romosinuano (n=8) de edad similar de 37 meses, tuvieron una concentración espermática similar de $1.009 \pm 0.6 \times 10^9/\text{mL}$, aunque menor al obtenido en los sementales CLT en la época calurosa de $1196.6 \pm 77.8 \times 10^6/\text{mL}$ y mayor al de la fresca de $776.0 \pm 77.8 \times 10^6/\text{mL}$ (Palmieri *et al.*, 2004). La COE en toros adultos Holstein x Sahiwal (n=7) fue inferior a $900 \times 10^6/\text{mL}$ (Andrabi *et al.*, 2002).

Movilidad individual

La MI media del semen de los sementales CLT fue de categoría buena y cercana a 77 % en la época calurosa; se mantuvo en la categoría buena en la época fresca, aunque fue menor que en la calurosa ($p \leq 0.066$). El valor mínimo de MI fue de 40 y el máximo de 98 %. Del total de eyaculaciones 50 % tuvieron $MI \geq 75$ %. En toros adultos de 4 a 6 años de edad (n=20) de la raza criolla Pampa Chaqueño de Paraguay, en dos muestreos por estación, se encontró que la MI fue de 70.5 a 71.5 y de 66.9 a 69.1 % similar ($p > 0.05$) en invierno y verano, con temperaturas ambientales de 6 a 42.5 °C (Oka *et al.*, 2012). En toros colombianos, Costeño

Con Cuernos y Romosinuano la media MI fue de 67.0 ± 8.0 y 68.0 ± 8.0 % (Palmieri *et al.*, 2004), similar a los sementales CLT de 68.3 ± 5.4 % en la época fresca. Los toros Sahiwal de hasta tres años de edad tuvieron una MI media a través de todo el año de 65.3 ± 0.4 % (Ahmad *et al.*, 2003). Sementales Holstein y Jersey tuvieron una MI de 71.0 ± 0.7 y 73.5 ± 0.8 % en época calurosa (Fiaz *et al.*, 2010), menores a la MI de los sementales CLT de 75.7 ± 5.4 % en la misma época. Los sementales CLT tuvieron una MI muy buena y buena para estándares de calidad de semen (Spitzer *et al.*, 1998).

Espermatozoides normales

En ambas épocas, fresca y calurosa, se estimó más de 75 % de EN, lo que se relaciona positivamente con la fertilidad de los sementales CLT (Irons *et al.*, 2007; Spitzer *et al.*, 1998); los espermatozoides anormales fueron menos de 30 %, valor umbral que no afecta la fertilidad. Toros 75 % *Bos indicus* x 25 % *Bos taurus* menores de 30 meses de edad tuvieron 70.9 ± 14.7 % de espermatozoides normales (Prieto *et al.*, 2007). Las eyaculaciones con EN menores de 70 % deben descartarse para su uso en IA (Barth y Oko, 1989).

Espermatozoides vivos

Los EV entre épocas fueron similares y superiores a 80 %. El intervalo de EV fue de 40 a 99 %, con 25 % de las muestras ≥ 90 %. En los sementales europeos los EV tuvieron una media de 72.3 ± 22.0 % (Valle *et al.*, 2005).

Potencial de hidrógeno

Esta característica no presentó variabilidad, observándose un valor de 7 en todas las mediciones realizadas. En el semen de toros europeos también se observó poca variabilidad en el pH de 6.7 ± 0.5 durante las épocas seca y húmeda (Valle *et al.*, 2005) y en toros Sahiwal de 6.9 ± 0.01 (Ahmad *et al.*, 2003). En toros reproductores valores de pH de 6.2 a 7.4 se consideran los más adecuados (Irons *et al.*, 2007). En el cuadro 8 se presentan las frecuencias observadas para las variables discretas.

Cuadro 8. Frecuencias estimadas (%) de características seminales discretas de toros Criollo Lechero Tropical en dos épocas del año.

Época	Movilidad masal			Color		Consistencia	
	Remolinos rápidos	Remolinos lentos	Sin remolinos	Blanco	Amarillento	Lechoso	Cremoso

Fresca (Diciembre- Febrero)	40.0	40.0	20.0	60.0	40.0	85.7	14.3
Calurosa (Abril- Junio)	65.8	17.1	17.1	82.9	17.1	82.9	17.1
	(p≤0.064)			(p≤0.009)		(p>0.050)	

Movilidad masal

De las cuatro categorías consideradas como respuesta en la MM, solamente se observaron tres, no presentándose el caso menos favorable de semen sin movimiento. El mayor porcentaje de remolinos rápidos se presentó en la época calurosa, siendo casi cuatro veces superior que los remolinos lentos y sin remolinos. En la época fresca los remolinos rápidos y lentos tuvieron la misma frecuencia, sin embargo ambas categorías sumaron al menos 80 % en las dos épocas, lo que es indicativo de una muy buena MM. Toros mestizos 75 % *Bos indicus* x 25 % *Bos taurus* tuvieron MM de 70.4±7.5 y 72.8±6.7 % en las épocas de invierno y verano respectivamente, menores a la MM de los sementales CLT (Prieto *et al.*, 2007). En el Cuadro 9 se presentan las medias estimadas de las características seminales por categoría de MM. Cada categoría de MM puede considerarse como indicadora de la calidad del semen. Los remolinos rápidos estuvieron relacionados a los mejores niveles de las características seminales, por lo que su determinación macroscópica en campo es uno de los medios eficaces para la identificación de eyaculados útiles para la elaboración de dosis de IA o de la capacidad fertilizadora del semen de sementales para monta natural.

Cuadro 9. Características seminales de sementales Criollo Lechero Tropical agrupadas por movilidad masal (medias mínimo cuadráticas ± error estándar).

Movilidad masal	Volumen (mL)	Concentración espermática (x 10 ⁶ mL ⁻¹)	Movilidad individual (%)	Espermatozoides normales (%)	Espermatozoides vivos (%)
Remolinos rápidos	4.4±0.2 ^a	1166.8±60.7 ^a	84.4±2.0 ^a	82.2±0.8 ^a	86.7±1.1 ^a
Remolinos lentos	3.5±0.2 ^b	773.0±77.2 ^b	65.2±2.6 ^b	77.2±1.0 ^b	82.8±2.0 ^a
Sin remolinos	3.9±0.3 ^{ab}	862.3±159.2 ^b	47.1±3.0 ^c	70.0±1.8 ^c	66.9±4.6 ^b

a, b, c: Medias con diferente literal en una columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05)

Color

De las cinco categorías de respuesta de CL, solamente se observaron las dos más favorables, lo que indica que colores asociados a semen de baja calidad no ocurrieron en los sementales CLT. El color blanco tuvo la mayor frecuencia en ambas épocas, aunque la diferencia con respecto al color amarillento fue casi cuatro veces mayor en la época calurosa. Los colores blanco y amarillento del semen son considerados de mejor calidad (Irons *et al.*, 2007). El volumen del eyaculado para los colores blanco y amarillento fue diferente con 4.23 ± 0.2 y 3.53 ± 0.2 mL ($p \leq 0.05$). Toros *Bos taurus* y *Bos indicus* de 32 meses de edad presentaron 95.3 % de eyaculados de colores amarillo claro a amarillo (Ruíz-Sesma *et al.*, 2010). Los toros colombianos tuvieron CL blanco mate, blanco lechoso y blanco claro (Palmieri *et al.*, 2004).

Consistencia

De las cinco categorías de respuesta de CS, solamente se observaron las dos más favorables, lo que indica que consistencias asociadas a semen de baja calidad no se presentaron en los sementales CLT (Irons *et al.*, 2007). La CS lechosa cremosa fue superior a 82 % en ambas épocas, lo que muestra una muy alta consistencia en el semen CLT. Aunque las consistencias lechosa cremosa y cremosa clara son indicativas de una mejor calidad de semen, la concentración espermática fue mayor ($p \leq 0.05$) en la primera con medias de 1048.3 ± 56.3 y $653.6 \pm 118.2 \times 10^6$ mL⁻¹, respectivamente. Toros *Bos taurus* y *Bos indicus* de 32 meses de edad tuvieron 94.4 % de eyaculados de consistencia lechosa cremosa a cremosa (Ruíz-Sesma *et al.*, 2010).

VI. CONCLUSIONES

No se observaron efectos detrimentales en las características seminales atribuibles a la época calurosa de mayor temperatura y humedad relativa. Las características seminales en los sementales jóvenes CLT tuvieron valores medios que pueden considerarse aptos para poder utilizar los eyaculados para la elaboración de pajillas de IA y para la utilización de sementales para monta natural en las diferentes estaciones. Sin embargo, la valoración individual previa de cada semental es necesaria para conocer su potencial reproductivo.

VII. LITERATURA CITADA

- Ahmad, M., M. T. Asmat, N. U. Rehman and M. Z. Khan. 2003. Semen characteristics of Sahiwal bulls in relation to age and season. *Pak. Vet. J.* 23(4):202-206.
- Amann, R. P. and B. D. Schanbacher. 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.* 57(12):380-403.
- Amann, R. P., and O. A. Walker. 1983. Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bull. *J. Anim. Sci.* 57:433-442.
- Andrabi, S. M. H., S. Haheed, L. A. Khan and N. Ullah. 2002. Semen characteristics of crossbred (Friesian x Sahiwal) bulls at livestock research station, National Agricultural Research Centre, Islamabad. *Pak. Vet. J.* 22(4):181-187.
- Anzola-Vázquez, H., A. E. Pedraza-Morales, M. G. Lezzaca-Gasca y H. Obando-Correa. 2007. Buenas prácticas de bioseguridad en centros productores de embriones y semen. Ed. Anónima. Impreso en Bogotá Colombia. 52 p.
- Baracaldo, M. I., A. D. Barth y W. Bertrand. 2007. Pasos para el congelamiento de semen bovino: desde la colección del semen hasta el almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org)*.
- Barth, A. D. 2001. Evaluation of sperm motility in bull breeding soundness evaluations. *Society for Theriogenology, July Newsletter.* pp. 4-5.
- Barth, A. D. and R. J. Oko. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. 285 p.
- Barth, A., B. O. Gabriel y H. Tribulo. 2000. Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal: 16 al 19 de agosto de 2000. 1ª ed. Córdoba (Argentina). Universidad Católica de Córdoba. pp. 3-10, 55.
- Berdugo, J., J. Alfredo y F. Avella. 1994. Producción espermática de toros en el trópico. *Revista el Cebú.* Colombia.
- Blockey, M. A. de B. 1981. Modification of a Serving Capacity test for beef bulls. *Appl. Anim. Ethol.* 7:321-336.
- Brito, L. F. C., A. E. D. F. Silvia, R. T. Barbosa and J. P. Kastelic. 2004. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology.* 61:511-528.
- Caraty, A., A. Locatelli, and G. B. Martin. 1989. Biphasic response in the secretion of gonadotropic releasing hormone in ovariectomized ewes injected with estradiol. *J. Endocrinol.* 123:375-382.

- Chacón, J., E. Pérez, H. Rodríguez-Martínez. 2002. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogram parameters of extensively reared Brahman. *Theriogenology*. 58:41-50.
- Chenoweth, P. J. 1990. Serving Capacity and Libido test for bulls their relationship to performance. *Procc. Beef Impr. Fed. Res. Symp. & Animal Meet.*, Montana, EUA. pp. 61-71.
- Chenoweth, P. J. 1983. Sexual behavior of the bull: A review. *J. Dairy Sci.* 66:173-179.
- de Alba, J. M. 2001. El libro de los bovinos criollos de América. Biblioteca Básica de Agricultura. Ed. Colegio de Postgraduados. México.
- de Alba, J. and B. W. Kennedy. 1994. Genetic parameters of purebred and crossbred milking Criollo in tropical Mexico. *Anim. Prod.* 58:159-185.
- Echeverri, J. 2003. Las situaciones de estrés en los toros: efectos en la reproducción. *El Cebú* N° 331. pp. 52-57.
- FAO. 1981. Recursos genéticos animales en América Latina. B. Müller-Haye y J. Gelman (eds). Roma, Italia. Folleto 22. 170 p.
- Fiaz, M., R. H. Usmani, M. Abdullah and T. Ahmad. 2010. Evaluation of semen quality of Holstein Friesian and Jersey bulls maintained under subtropical environment. *Pak. Vet. J.* 30(2):75-78.
- Fields, M. J., W. C. Burns and A. C. Warnick. 1979. Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. *J. Anim. Sci.* 48:1299-1304.
- Galina, C. y J. Valencia. 2006. Colección del semen bovino. Reproducción de animales domésticos, Ed. Noriega editores. México. pp. 217-219.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 191 p.
- Gazitúa, R. 2004. Examen de los genitales masculinos y próstata. www.mdp.edu.ar/agrarias/grado/736/archivos/5_toros.pdf.
- Hafez, E. y B. Hafez. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Ed. McGraw-Hill. México. pp. 360-522.
- Hafez, E. S. E. y B. Hafez. 2000. Espermatogénesis. Reproducción e Inseminación en Animales, Ed. McGraw Hill. USA. pp. 101-105.
- Irons, P. C., J. O. Nöthling and H. J. Bertschinger. 2007. Bull breeding soundness evaluation in Southern Africa. *Theriogenology*. 68:842-847.
- Knobil, E. and J. D. Neil. 2003. Spermatogenesis, Overview. *Encyclopedia of reproduction* Vol. 4. M-Pri. San Diego California. pp. 49-59.

- Knights, R. L. Barker, D. Gianola and J. B. Gibb. 1984. Heritabilities and genetic and phenotypic correlations among growth and reproductive traits in yearling Angus bulls. *J. Anim. Sci.* 58:887-893.
- Little, R.C., G. A. Milliken, W.W. Stroup and R. D. Wolfinger. 1996. SAS system for mixed models. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Madrid-Bury, N., C. González-Stagnaro, J. A. Aranguren-Méndez, F. Yanez y A. Quintero-Moreno. 2011. Comportamiento sexual en toros Criollo Limonero. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 28(1):505-513.
- Madrid-Bury, N., S. Zambrano, A. Zambrano, E. Bohada, C. González-Stagnaro, Z. Chirinos. 1997. Características reproductivas de toretes mestizos Pardo Suizo x Cebú en Venezuela. *ALPA*. 5(1):350-352.
- Madrid-Bury, N., R. González, E. Soto, C. González-Stagnaro y J. Aranguren-Méndez. 1994. Circunferencia escrotal, crecimiento y características seminales de toretes mestizos F1 ½ Brahman x ½ Holstein. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 11(2):127.
- Malo, A. F., J. J. Garde, A. J. Soler, A. J. García and M. Gomendio. 2004. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 72:822-829.
- Mickelsen, W. D. 1990. Breeding soundness examination of the bull: factor fiction. Unpublished paper. School of Veterinary Medicine. Washington State University, Pullman, Washington.
- Morillo, M., S. Salazar, E. Castillo. 2012. Evaluación reproductiva del macho bovino. INIA. Centro Nacional de Investigadores Agropecuarias. 63 p.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-027-ZOO). 1995. Proceso Zoosanitario del Semen de animales domésticos. *Diario Oficial*. Primera sección. pp. 41-48.
- Neely, J., B. Johson, E. Dillar and O. Robison. 1982. Genetic parameters for testes size and sperm number in Hereford bulls. *J. Anim Sci.* 55:1033.
- Oka, Y. A., H. A. Oka, C. Prieto y L. N. Branda. 2012. Efecto de la temperatura ambiental en la calidad seminal de toros Pampa Chaqueño criados bajo condiciones de campo en la región occidental, Chaco Paraguayo, en las diferentes estaciones del año. *Act. Iber. Conser. Anim.* 2:181-184.
- P. L. Senger, Ph. D. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. Second revised edition. Emeritus Professor Washington State University Pullman, Washington 99164-6332 USA. pp. 230-231.
- Palacios, C. J. 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. Memorias de postgrado de reproducción bovina. CGR Colombia.

- Palmieri, R., D. Suarez, A. Espitia, M. González y E. Prieto. 2004. Variables seminales en toros criollos Colombianos Con Cuernos y Romosinuano. Rev. MVZ Córdoba 9(1):381-385.
- Prieto, M. E., A. Espitia P. y J. Cardozo N. 2007. Efecto del invierno y verano sobre el comportamiento reproductivo de toros cruzados. Rev. MVZ Córdoba 12(1):921-928.
- Prieto, R., D. Suarez, A. Espitia, M. González y E. Prieto. 2004. Variables seminales en toros criollos Colombianos Con Cuernos y Romosinuano. Rev. MVZ Córdoba 12(1):921-928.
- Rekwo, P. I., A. A. Voh Jr., E. O. Oyedipe, G. L. Opaluwa, V. O. Sekoni y P. M. Dawuda. 1987. Influence of season on characteristics of the ejaculate from bulls in an artificial insemination center in Nigeria. Anim. Reprod. Sci. 14:187-194.
- Rosendo, A. and C. M. Becerril. 2002. Productive performance and genetic parameters in the tropical milking Criollo cattle in Mexico. Proc. 7th World Congress Genetic Applied Livestock Production. Montpellier, France. Commun N° 25-25.
- Rouse, J. E. 1977. The Criollo. Spanish cattle in the Americas. University of Oklahoma Press. Oklahoma. 303 p.
- Ruíz, D. F. 1988. Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. UNAM. 1^a Ed. pp. 13-80.
- Ruíz-Sesma, B., H. Ruíz-Hernández, P. Mendoza-Nazar, M. A. Oliva-Llaven, F. A. Gutiérrez-Miceli, R. I. Rojas-Martínez, J. G. Herrera-Haro, D. L. Ruíz-Sesma, G. Aguilar-Tipacamu, H. León-Velasco, G. U. Bautista-Trujillo, A. J. Ruiz-Moreno, C. E. Ibarra-Martínez y A. Villalobos-Enciso. 2010. Caracterización reproductiva de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruzas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico de Mexicano. Rev. Científica. UDO. Agrícola. 10(1):94-102.
- Salisbury, G., N. Vandemark y J. Lodge. 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Acribia. Zaragoza España. 832 p.
- SAS Institute. 2010. SAS 9.3 for Windows. SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA.
- Schanbacher, B. D., M. J. D'Occhio and T. W. Gettys. 1983. Pulsatile luteinizing hormone secretion in the castrate male bovine: effect of testosterone or estradiol replacement therapy. J. Anim. Sci. 56:132.
- Spitzer, J. C. 2000. Evaluación de salud reproductiva del toro: estado actual. International Veterinary Information Service, Ithaca NY f www.ivis.org).
- Spitzer, J. C., F. M. Hopkins and P. J. Chenoweth 1998. New guidelines for breeding soundness evaluation (BSE) of bulls. Clemson Cooperative Extension Service. USA. 4 p.

- Valle, A., A. Fuentes y M. Puerta. 2005. Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo Suizo nacidos en el trópico. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 22:52-61.
- Van, V. D. A., G. Bakst., I. Dyrenfurth and M. Ferin. 1983. Naloxone stimulation of luteinizing hormone secretion in the female monkey: influence of endocrine and experimental conditions. *Endocrinology*. 113:1858.