INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA AMBIENTE EN LA ESPERMATOGENESIS DE TORETES JERSEY

Por

Simón Riera G.

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

Turrialba, Costa Rica

Junio, 1963

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA AMBIENTE EN LA ESPERMATOGENESIS DE TORETES JERSEY

Tesis

Sometida al Consejo de Estudios Graduados
como requisito parcial para optar al grado

de

Magister Agriculturae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

APROBADO: _____ Consejero

_____ Comité

_____ Comité

Junio, 1963

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

AGRADECIMIENTO

El autor agradece:

Al Dr. Jorge de Alba, por sus inapreciables servicios y orientación en el curso de este trabajo.

A la Fundación Rockefeller, por brindarme la oportunidad de realizar estudios postgraduados.

Al Dr. Ludwig Müller y Al Ing. Héctor Muñoz, por sus valiosas cooperaciones durante el transcurso de este trabajo.

Al Departamento de Fitotecnia, por el uso del Laboratorio de Microtécnia.

BIOGRAFIA

Simón Riera Guzmán, nació el 24 de setiembre de 1933, en Vitichi, Potosí, Bolivia.

Hizo sus estudios primarios en su ciudad natal, en los años 1942-1947. Después de estudiar en los años 1948-1954, en el Colegio Nacional "Pichincha" de Potosí, obtuvo el diploma de Bachiller en Humanidades. En 1956 ingresó a la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Simón en la ciudad de Cochabamba, hasta 1960. Recibió el título de Ingeniero Agrónomo en abril de 1962.

Trabajó para el Servicio Agrícola Interamericano, desde marzo de 1961 hasta mayo de 1962, cuando ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en Turrialba, como estudiante postgraduado del Departamento de Industria Animal hasta la presentación de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION

El ambiente tiene influencia sobre la productividad de los animales. La investigación tiene por fin determinar en qué sentido influye ese factor en el rendimiento de la explotación. Uno de los problemas que confronta el hombre dedicado a la explotación animal es la aclimatación de razas a regiones distintas a las de su origen. Es particularmente notable este hecho en bovinos. Muchas de las zonas tropicales y subtropicales del mundo tienen calor y humedad similares. Es necesario conocer los efectos del clima en los mecanismos termo-reguladores, características de semen y fertilidad de toros de clima templado llevados al trópico. Se opina que ciertas razas son más adaptables que otras. Pero hay pocos estudios cuidadosos que determinan la interacción entre clima y la fertilidad.

Es injusto atribuir el atraso de la zootecnia tropical exclusivamente al bajo valor nutritivo de los forrajes, o a la alta infestación parasitaria, o al mal manejo. Es igualmente importante la capacidad reproductiva del ganado. La reproducción no tiene mayor prioridad en las funciones del organismo. Es secundaria al crecimiento; pero tiende a reducirse o anularse en muchos estados anormales.

Los animales homeotérmicos operan normalmente dentro de un margen pequeño de diferencias en temperatura corporal. Se cree que,a mayor esfuerzo hecho por el animal para compensar excesos o deficiencias de temperatura corporal, sobreviene una reducción de sus funciones vitales.

El objeto de este trabajo fue determinar la influencia del calor y de la humedad, sobre la edad al primer salto con espermatozoides móviles, la calidad del semen, el desarrollo y la función testicular en toretes Jersey.

REVISION DE LITERATURA

El testículo, tiene doble función: Una filogenética (Producción de espermatozoides) y otra hormonal. Cuando está plenamente desarrolado, es un órgano muy activo. Estudios histológicos han demostrado que está formado por tubos seminíferos, células intersticiales, tejido conjuntivo, y vasos sanguíneos. Dentro del tubo seminífero hay células germinales y otras llamadas de Sertoli. En el acto de la copulación, el macho eyacula muchos millones de espermatozoides. Para esto la superficie del epitelio germinal tiene que ser grande. Salisbury y VanDemark (46) estimaron que el largo de los tubos seminíferos del toro, puesto uno seguido de otro, es aproximadamente de 4,83 Km. y 200 micras de diámetro. Además, estimaron que el 80% del peso del testículo corresponde a los tubos. Mientras que Nalvandov (39) calculó que el 90% del peso testicular es de los tubos.

La diferencia entre el peso testicular y el peso de los tubos seminíferos la constituyen las células intersticiales y tejido conjuntivo, que cumplen la función de secretar hormonas sexuales, nutrir espermátidas y servir de tejido de estructura. La masa testicular esta cubierta por la túnica albugínea de la que emergen haces de tejido conjuntivo en dirección al mediastinum. Estos haces dividen al testículo en lóbulos, que son unidades funcionales que finalizan en un tubo recto. Pasan luego al epidídimo, donde los espermatozoides se almacenan y sufren su última maduración y almacenaje hasta el momento de la eyaculación (11, 39, 40, 46). El rápido desarrollo de la inseminación artificial en animales domésticos ha fomentado la investigación sobre la reproducción. La mayoría de estos trabajos se hicieron para conocer el comportamiento de los espermatozoides en el plasma seminal (40). Sin embargo, estos espermatozoides representan sólo el producto final de una serie de cambios (Espermatogénesis) complejos. Ocurren estos cambios en los tubos seminíferos y determinan el número y propiedades de los espermatozoides (11, 16, 22, 39, 40, 46).

La célula germinal primordial que origina el testículo es el gonocito. Los gonocitos se multiplican y, algunos meses después del nacimiento, dan lugar a la espermatogonia y posteriormente al espermatozoide. Estas divisiones constituye el punto principal de la espermatogénesis. La eficiencia cuantitativa de la espermatogénesis depende de la rapidez y regularidad con que estas divisiones se realizan.

La historia del ciclo espermatogenético empieza con la espermatogonia tipo A, futuras divisiones dan lugar a espermatogonio intermedio, espermatogonio B, espermatocitos primarios y secundarios y espermátidas. La metamorfosis de las espermátidas en espermatozoides constituye la espermateliosis (40). La calidad del espermatozoide producido depende de estos cambios que empiezan en los tubos seminíferos y terminan en el epidídimo (40).

En el ciclo espermatogenético se han distinguido ocho estados o fases (16, 40). Ortavant denomina estados a una serie de cambios ocurridos en un área dada del epitelio seminífero entre dos apariencias sucesivas de la misma asociación celular. La duración del ciclo espermatogénetico es el intervalo entre la presencia de un espermatogonio original y el desprendimiento de los espermatozoides producidos de él (40, 41, 42).

Efecto de la temperatura

Es conocido que el ganado vacuno sometido a condiciones tropicales es afectado en su productividad. Uno de los factores que más influye sobre esta productividad es la capacidad de reproducirse. Moore (38) notó en 1922 que un macho criptórquido produce espermatozoides con escasa viabilidad. El demostró experimentalmente que, introduciendo los testículos en la cavidad abdominal, se produce una degeneración del epitelio germinal. Posteriormente varios investigadores (5, 15, 20, 27, 34, 40, 44,

50, 51), utilizando temperaturas de 90-100º F., por cinco semanas o más en cámara climática, encontraron que las altas temperaturas deprimen el proceso de la espermatogénesis. Para recobrar la habilidad espermatogenética, estos animales necesitaron 6-8 semanas. Los espermatocitos y espermátidas fueron las primeras células afectadas por la temperatura (40, 44, 51, 59). El sobrecalentamiento corporal aumenta la temperatura testicular en 2,5º C. más o menos con respecto a la temperatura del escroto, que esta aproximadamente a 6,5º C., más frío que el cuerpo (20, 44). Pruebas experimentales demuestran que las temperaturas elevadas incrementan en 25% los espermatozoides anormales (20). Los espermatozoides defectuosos generalmente están asociados con la disminución del volumen y la menor concentración de espermatozoides en la eyaculación (20, 27, 29, 50). Casady et al (15) en cámara climática a 85º F., encontraron que toros lecheros con semen de 40% de motilidad inicial bajaron a 20%. En otro grupo, el descenso fue de 60 a 0%. Observando microscópicamente el tejido testicular, los autores mencionados notaron insuficiencia en el desarrollo del epitelio germinal. Las lesiones testiculares variaron en razón directa con la intensidad de exposición a la temperatura. Toros sometidos a 86.4º F., mejoraron las características del semen, finalizado el tratamiento. Los expuestos a 98.9º F., no mejoraron el tejido ni el semen.

Actualmente, tanto como en lo pasado, causan curiosidad los mecanismos termo-reguladores en animales domésticos adaptados a climas tropicales (15, 20, 27, 29, 34, 38, 40, 44, 50, 51, 58, 59). Así Phillips y McKenzie (44) observaron que en moruecos una temperatura de 33.3º C. en el escroto, corresponde a 34.9º C. en el testículo. Con tratamiento de temperatura de 4-16 semanas a 36,4º C. y 37º C. en el escroto y testículo respectivamente, observaron degeneración del epitelio germinal (Edemas

células gigantes, desintegr ción de células, ausencia de espermatozoides en la mayoría de los tubos) disminución en el peso del testículo, etc. El escroto y la túnica dartos, en condiciones de temperatura elevada desempeñan el papel termo-regulador. La túnica dartos y el músculo cremaster se relajan y contraen para regular la temperatura del testículo con respecto al cuerpo. Estas reacciones están relacionadas con el sistema nervioso autonómico.

Los mayores daños causados por la temperatura ocurren en la modificación de las características del semen (5, 15, 20, 27, 29, 37, 44, 50, 59), espermatozoides vivos y muertos, volumen, pH, vitalidad, concentración, motilidad y conformación. Se denominan anormales, a los espermatozoides, que presentan dos colas, cola en espiral, gotas citoplasmáticas en la parte media, cabeza piriforme o alargada, sin cola, con dos cabezas, etc.

Espermatozoides vivos y muertos

Varios autores coinciden en afirmar que la temperatura incrementa el porcentaje de espermatozoides muertos (7, 15, 18, 29, 36, 47, 48). Para determinar espermatozoides vivos y muertos, se utilizan diferentes mezclas y colorantes: Eosina B y azul de anilina (31, 36, 49), eritrosina B y eosina B (18), eosina y nigrosina (7, 28), azul de opal (46), bromofenol y nigrosina (48). El mecanismo de diferenciación de espermatozoides vivos y muertos no es bien conocido. Se cree que el coloreo depende de la presencia en el colorante de una substancia ionizable. Los colorantes difieren en la cantidad de halógenos substituibles. Esta diferencia tiene influencia sobre el coloreo (18). El pH óptimo para el teñido fue de 6.8. Soluciones inferiores a pH 5.8 aglutinaron los espermatozoides, y mayores a pH 8.5, separan la cabeza de la cola de los espermatozoides (18).

Casady y colaboradores (15) encontraron en toros expuestos a temperatura de 98.9 y 86.4º F. en cámara climática 70.6 y 72.8% de espermatozoides muertos. En zonas con marcados cambios estacionales (29), en ovinos determinaron que a mayor temperatura el porcentaje de espermatozoides vivos fue en disminución. La motilidad está altamente correlacionada (r=.9) con el porcentaje de espermatozoides vivos (48). La transmisión de la luz medida con nefelómetro (opacidad) está correlacionada (r=.7), con el porcentaje de espermatozoides muertos (7, 29). Austin y colaboradores (15) con toros en ambiente de 92º F. de temperatura, después de la segunda y tercera semana de tratamiento encontraron el 65% de espermatozoides vivos. Sukla (50) en cabras, encontró mayor porcentaje de espermatozoides muertos en la estación más caliente.

Vitalidad y concentración de espermatozoides

Las pruebas de reducción del azul de metileno y la resazurina son buenos criterios de medida de la calidad de semen (52). El principio se basa en que el azul de metileno es reducido, cuando acepta dos átomos de hidrógeno, y el semen se oxida. No está bien determinado el momento del intercambio iónico. Lo más probable es que el hidrógeno sea aceptado en un producto intermedio de la glicólisis y que forma el ácido láctico. No existe correlación entre el tiempo de reducción del azul de metileno y la proporción de espermatozoides anormales y el contenido de glucosa en el semen fresco. Pero fue alta la correlación entre la reducción del azul de metileno y el volumen eyaculado, la concentración, la motilidad inicial, el pH y ácido láctico inicial. La actividad reductora está asociada con la respiración y la glicólisis. En dos centros de inseminación artificial no encontraron correlación entre el tiempo de reducción y la fertilidad (47). Mercier y Salisbury (37) consideran semen deficiente cuando la concentración de espermatozoides es de 9.0×10^5 por mm^3, 70% de motilidad y que tardan

once minutos en reducir el azul de metileno. La prueba del azul de metileno puede ser substituida por la resazurina, que se reduce cambiando de color azul a rosa al transformarse en resorufina. Si se deja pasar más tiempo, cambia a color blanco, que es la hidro-resorufina (46).

La concentración de espermatozoides en una eyaculación varía entre individuos de una especie y aun dentro de una raza. La concentración de espermatozoides activos es de importancia para las medidas de motilidad (46, 52). Existe estrecha correlación r=.98 entre concentración y transmisión de luz por espectrofotómetro. Semen que contiene menos de 9.0 x 10^5 por mm^3 se considera deficiente (37), bueno de 2.0 a 5.0 x 10^6 o más espermatozoides (46). Almquist y Amann (1) en pruebas de agotamiento de reservas gonadales y extragonadales, encontraron 37.7 a 118.2 billones de espermatozoides. El cálculo por gramo de testículo resulta 54.8 millones. Posteriormente, por el mismo método otros autores (33) obtuvieron 37.0 millones de espermatozoides por gramo de testículo por semana. El número de espermatozoides fue altamente correlacionado con el peso del testículo (33, 58). Estas cifras corresponden a toros de dos años de edad o más. Walton (54) sostiene, que la décima parte del total eyaculado proviene del testículo, la diferencia es de las glándulas accesorias. En 63 minutos, un toro eyaculó 29 ml. de semen, de los cuales sólo 6 ml. fueron del testículo. La concentración de espermatozoides varía con las estaciones del año (29). La eficiencia de la espermatogénesis en algunas especies es estacional (40, 50). En una prueba (21), con moruecos esquilados y no esquilados a 90º F. de temperatura, se presentó considerable descenso en la concentración. La edad del toro es un factor que determina la concentración de espermatozoides. Flipse (23), encontró que toros de 72, 96 y 112 semanas produjeron 803,1354 y 1590 millones por ml. de semen.

Motilidad

La motilidad es signo importante de la vitalidad y calidad del semen. Los espermatozoides pueden perder su poder fecundante antes que su motilidad, aśi esta cualidad, aunque muy útil no significa una garantía abosuluta de fertilidad (46). Algunos autores afirman que hay espermatozoides activos en el testículo, epidídimo y conductos deferentes (55). Otros sostienen que los espermatozoides se activan cuando entran en contacto con la secreción de las glándulas accesorias (46, 55). Gunn, citado por Walton (55), insertó un tubo capilar en el conducto deferente de conejos. Los espermatozoides expulsados por estímulo eléctrico se mantuvieron inactivos. Pero hubo un aumento paulatino en la motilidad, que él atribuyó a la difusión del aire por el tubo. Este experimento sugiere que el intercambio de gases, ya sea presencia de O_2 o pérdida de CO_2 sería una causa de activación. Bishop y Mathews (10) consideran, que la falta de O_2 combinado con ausencia de azúcar glicolizable es la causa más probable de inhibición. El pH óptimo para la motilidad es 7,2 a 7.9

Los cambios estacionales en toros y moruecos afectan la motilidad del espermatozoide (29, 37, 50). El tratamiento artificial de temperatura en estas especies tiene como consecuencia la depresión en la motilidad (5, 15, 21, 36). En cámara climática a 96.4º F., la motilidad inicial fue 44% y descendió a 20%. Incrementando la temperatura a 98.9º F., se redujo la motilidad de 60% a 0% (15). Está estrechamente correlacionada con el porcentaje de espermatozoides vivos y con el tiempo de reducción del azul de metileno (37, 48). Lasley (36) no encontró correlación entre la motilidad y la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Conformación de Espermatozoides

Existe estrecha relación entre la morfología y la fertilidad de los espermatozoides. Los defectos se representan en la cabeza, parte media y

Existe entre ella relación entre la morfología y la fertilidad de los organismos. Los defectos se representan en la cabeza, parte media y

cola, e interfieren con la motilidad progresiva. Se dice que el semen es de buena calidad si contiene 5-15% de espermatozoides anormales, y deficiente cuando tiene más del 20% (31).

Muchos investigadores están de acuerdo en afirmar que la temperatura elevada disminuye la calidad del semen. El mayor efecto se presenta en la conformación de los espermatozoides. En 1934 (44), con temperatura artificial, se obtuvieron espermatozoides defectuosos después de una semana de tratamiento con temperatura elevada. Branton y Salisbury (13) determinaron que el porcentaje de espermatozoides defectuosos de un toro en condiciones naturales es constante, así mismo es constante en todos los conductos del órgano genital, con variaciones insignificantes. Pero entre toros, existe alta variabilidad. El defecto más frecuente es de la cabeza. Branton y Salibury (13), concluyeron que el origen de espermatozoides anormales es el testículo.

Existen influencias estaciones en la conformación de espermatozoides (29, 50). Con tratamientos de temperatura y criptorquidismo artificiales, obtuvieron 14.9 a 26.3% de espermatozoides anormales en toros (5, 15, 28), y en morueco de 25 a 66% (20, 21, 27, 29). Hasta aquí se ha hecho referencia a los defectos de la cabeza del espermatozoides. Sin embargo, de otros estudios (8, 20, 21, 29), informan que la cola y parte media también presentan defectos morfológicos.

Bialy y colaboradores (8) encontraron otro tipo de anomalidad, que denominan gota citoplasmática persistente (cytoplasmic-droplet). Esta característica es prototipo del espermatozoide inmaduro, que se encuentra en los epidídimos. El porcentaje medio de espermatozoides con gotas citoplasmáticas, en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo fue de 62,41 y 84%. Estos espermatozoides mezclados con fluido de la vesícula seminal disminuyeron significativamente el porcentaje de este defecto.

Influencia de la alimentación, peso del animal y edad sobre la actividad espermatogenética

En la literatura, se encuentran informes sobre la probalbe influencia de la nutrición en la reproducción de bovinos. Walton (54) sostiene que, siempre que haya una adecuada nutrición para el mantenimiento de la salud del cuerpo, las necesidades del testículo están satisfechas. Sin embargo, algunos experimentos establecen el efecto favorable de raciones especiales sobre las características del semen, desarrollo del cuerpo y madurez sexual. En toros lecheros, alimentados con 70, 100, 115 y 130% de las normas en N.D.T.,* se encontró que desde la pubertad hasta 96 semanas de edad las características del semen fueron significativamente deficientes (24). Branton y colaboradores (12) determinaron los efectos de N.D.T. y proteína por separado sobre la producción de semen en toros Holstein y Guernsey. Analizando las características del semen, concluyeron que toros sometidos a 120 y 140% de las normas de N.D.T. y 12% de proteína mostraron mejores características que los alimentados con 100% de lo recomendado y 16 y 20% de proteínas. Otro estudio (35) contradice las afirmaciones anteriores con pruebas realizadas con toros Jersey y Holstein, en sentido de que a mayor nivel de proteína mejores características de semen.

Reid y colaboradores (45) en toros alimentados con 12 y 21.7% de proteína, no encontraron diferencia en la calidad del semen cuando suministraron 1.18 libras diarias por cada 100 Kgr. de peso vivo. Flipse (23) con 4 toros gemelos idénticos, comparó las características de semen de toros alimentados con ensilaje de maíz.(2.2% P.D.) y

---

* Nutrientes digestibles totales.

concentrado (16% P.D.). Encontró pequeña diferencia, pero sin significado estadístico, en favor del grupo alimentado con ensilaje.

En resumen, los resultados obtenidos con tratamientos nutricionales en las características del semen indican que, satisfechas las necesidades nutritivas de mantenimiento, la influencia de nutrimentos adicionales sobre la calidad del semen es nula.

El peso del animal tiene importancia en la edad de la pubertad. Bratton y colaboradores (14), realizaron un experimento con 10 toretes Holstein, distribuidos en tres grupos, y encontraton lo siguiente:

Grupo	% N.D.T.	Edad de producción de semen, en semanas	Peso vivo Kgs.
A	160	39± 4.6	320
B	100	46± 11.6	281
C	60	58± 5.7	235

Las diferencias entre grupos en peso y edad de producción de semen fueron estadísticamente significativas. Flipse y otros (24) alimentaron toros lecheros con 70, 100, 115 y 130% de los recomendado por las normas en N.D.T. y determinaron que toros del primer grupo llegaron a la madurez sexual 14 semanas más tarde que los tres grupos restantes. En otra prueba experimental Flipse (23), con toros Guernsey gemelos idénticos, encontró lo que se resume en el cuadro siguiente:

Grupo	% Proteína	Madurez sexual edad semanas	Peso vivo Kgs.
Concentrado	16.0	41	132
Ensilaje de maíz	2.2	39	128

En los exámenes de las características de semen a 96 semanas de edad no encontró diferencia entre tratamientos. La edad y el peso están estadísticamente correlacionados r=.989 (6, 58). Asimismo, hay correlación entre edad, peso y número de espermatozoides producidos r=.514 y r=.533 respectivamente (6).

Los coeficientes de regresión para la producción de semen fueron de tendencia rectilínea ascendente, desde la pubertad hasta la madurez, posteriormente empezaron la inflexión y tiende a descender (58).

Las características y función del testículo no son las mismas en diferentes edades. La estructura del testículo en bovinos difiere desde el nacimiento hasta la madurez (39). El metabolismo testicular en individuos jóvenes es mucho más activo. No hay cambios significativos en el cociente respiratorio con el incremento de la edad después de la pubertad (32).

Fossland y colaboradores (25) realizaron un estudio en cuatro estados de la vida de 56 toros. Las observaciones indican que, en el período neonatal, no hay diferenciación entre espermatogonios y células precusoras. A catorce semanas de edad encontraron espermatócitos primarios y espermatogonios bien diferenciados. Al Estado prepuberal los espermatócitos primarios se dividen. Hay aumento en diámetro de los tubos (de 70 a 150 micras). En la pubertad hay progresiva actividad espermatogenética. Se observan espermatócitos secundarios, espermátidas

inmaduras, espermatozoides en el lumen del tubo, epidídimo y conducto deferente. En estado de madurez sexual hubo grandes incrementos en el peso del testículo (de 250 a 300 g.); el diámetro de los tubos se incrementa de 200 a 250 micras. En la madurez sexual, la proporción de células intersticiales fue menor, comparada con los tubos seminíferos. Otro estudio semejante hicieron Phillips y colaboradores (43) con nueve toros de 63 a 450 días de edad. En exámenes histológicos encontraron variaciones de 70 a 217 micras de diámetro en los tubos seminíferos a distintas edades. Observaron a los 104 días espermatócitos primarios, a los 142 días espermatócitos secundarios y espermatozoides a los 242 días. Se presentaron espermatozoides en todos los tubos a 450 días de edad.

Reservas extragonadales

Se sabe que para garantizar la fecundación del óvulo, el macho eyacula muchos millones de espermatozoides. La espermatogénesis en toros se realiza continuamente. En los tubos seminíferos no hay incompatibilidad entre el tiempo y el espacio. La razón multiplicativa entre el espermatogonio A y espermatócito primario en toros con espermatogénesis normal es 1.16, y en los anormales, 1:10 (40). Esta última proporción se presenta posiblemente en animales de reproducción estacional, debido a que la eficiencia de las divisiones disminuye y, consecuentemente, la concentración (40). Las primeras medidas directas de espermatozoides en reservas extragonadales fue realizado por Walton y Edwards (56). Con 10 eyaculaciones de 14 toros en un período de dos horas, obtuvieron 17.5 billones de espermatozoides. Subsecuentemente, Hale y Almquist (30) informaron sobre más pruebas de agotamiento, con 10 toros obtuvieron 80 muestras que contenían 37.7 billones de espermatozoides. Almquist y colaboradores (2) contando espermatozoides de la cabeza, el cuerpo y la cola

del epidídimo y encontraron 19,4; 4.7 y 37.6 billones de espermatozoides. La producción de espermatozoides está altamente correlacionada con el peso del testículo (1, 2, 33). Estos autores en experimentos semejantes determinaron 18.4 x 10^9 y 19.7 x 10^9 espermatozoides por testículo, por semana y 56.3 x 10^6 y 36.8 x 10^6 por g. de testículo también por semana (2, 33).

Las reservas gonadales y extragonadales se han tratado de determinar indiredtamente por medio de pruebas de agotamiento (1, 2, 3, 4, 9, 30, 40, 46, 56). La relación del número total de espermatozoides colectados en pruebas de agotamiento no están muy bien establecidas.

Diversos autores han utilizado métodos de lavado de los conductos genitales con soluciones isotónicas (1, 3, 9). Existe un segundo método para determinar estas reservas que consiste en moler segmentos del órgano reproductor. Para este objeto se utilizan licuadoras y soluciones isotónicas de ácido cítrico (19), o Na Cl al 0.9% (3, 19). Ortavant, citado por Amann (3) determinó que el tiempo de molido suficiente para liberar espermatozoides contables fue de dos minutos. Con este método Almquist y colaboradores (1) encontraron 72.6 billones de espermatozoides en ambos testículos. Bialy y Smith (9) expresaron así en porcentaje el contenido de estermatozoides del epidídimo:

Epidídimo

Cabeza %	Cuerpo %	Cola %	Total %
36.24	18.34	45.42	100

Amann y Almquist (3), con toros de dos a doce años de edad, liberaron espermatozoides de testículo y epidídimo macerados en Na Cl al 0.9% y molidos en una licuadora (Waring Blender). Contaron con hemocitómetro y determinaron las reservas gonadales y extragonadales con los siguientes resultados:

Epidídimo

Testículo Nº x 10^9	Epidídimo Cabeza 10^9	Epidídimo Cuerpo x 10^9	Epidídimo Cola 10^9
17.5o	6.0	1.53	9.66

La concentración de espermatozoides en eyaculaciones, reservas gonadales y estragonadales varían entre individuos de la misma especie y dentro de la raza. Estas variaciones están ligadas a la actividad espermatogenética del epitelio germinal de los tubos seminíferos (40). La baja fertilidad en los toros en muchas ocasiones se debe a la baja concentración de espermatozoides en el semen. En un experimento Cupps y Laben (16) encontraron 17.2% de tubos seminíferos degenerados (células multinucleadas, cambios degenerativos en la pared del epitelio germinal en toros que produjeron semen de baja concentración. Ortavant (40) desarrolló un método para contar los estados del ciclo de la espermatogénesis. Clasifica ocho estados en que la frecuencia es constante en toros de espermatogenésis normal. Cupps (16) sin embargo, en un trabajo similar, demostró que en toros con espermatogénesis anormal, la frecuencia del estado tres fue mayor (35.6%). En los toros normales, las frecuencias de los estados son parecidas a las encontradas por Ortavant (40). Los datos del siguiente cuadro resumen las frecuencias encontradas por Ortavant y Cupps (16, 40).

	Estados del ciclo del epitelio seminífero								Tubos degenerados
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Ortavant	27.5	13.9	20.8	11.6	2.0	6.4	7.3	10.5	---
Cupps	12.7	6.4	35.6	9.7	---	2.2	9.9	5.9	17.2

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ganadería del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, en Turrialba (Costa Rica).

Turrialba se encuentra en la vertiente del Atlántico a 610 metros de altura, tiene precipitación media de 2.600 mm. y temperatura media de 21ºC.

En este experimento se utilizaron 18 toretes Jersey, hijos de un mismo padre provenientes de la Finca "Robert" en el volcán Irazú. Los 18 toretes se distribuyeron en dos tratamientos, diez en cámara climática y ocho en el ambiente natural de Turrialba.

La edad y el peso de los animales al empezar el experimento fueron los siguientes:

Tratamientos	Edad semanas	Peso promedio Kg.
Cámara climática	26 ± 15	81.0
Ambiente natural	26 ± 15	78.0

<u>Tratamientos</u>

1. Se utilizó la cámara climática del Departamento de Ganadería, regulada a una temperatura ambiente de 36-37ºC. y una humedad relativa aproximada de 80-90%; durante ocho horas diarias (7 A.M. a 3 P.M.). Las 16 horas restantes se dejó bajar la temperatura libremente, y osciló entre 26 y 27ºC.
2. Se utilizó otra cámara con temperatura y humedad similares a las naturales de Turrialba. La temperatura máxima fue de 27ºC. y la mínima de 19ºC. La humedad relativa en esta

cámara fue de 80-90%. En ambas cámaras hubo un ventilador para mantener un movimiento de aire. Las temperaturas en este tratamiento se registraron con un higrotermógrafo, y la humedad fue determinada diariamente por medio de psicrómetro.

En los dos ambientes, se mantuvo la misma intensidad de iluminación artificial durante 12 horas (6 A.M. a 6 P.M.).

Durante el experimento hubo dos períodos y dos tipos de alimentación.

Los toretes puestos en la cámara climática y ambiente natural fueron sujetos a un experimento anterior (53), para probar efecto de la fibra cruda en la nutrición de bovinos en ambientes cálido húmedo. El diseño de este experimento comprendía dos ambientes y dos raciones con 21 y 16% de fibra. En el presente experimento, permanecieron 222 días con raciones de 21 y 16% de fibra. Basándose en los resultados del anterior experimento, en el que no hubo diferencias entre los dos niveles de alimentación a la tolerancia del calor, se suprimieron esas dos raciones. La ración, hasta el final del experimento (81 días), fue una mezcla de maíz, harinolina y copra, que contenía 19,8% de proteína y 77,5% de N.D.T.

En esta mezcla se incluyeron vitaminas y minerales en las siguientes proporciones:

Crecebón*	1% que contiene:
Vitamina A	242,5 unidades de F.E.U. por gramo
Vitamina D_2	440,9 unidades de F.E.U. por gramo
Vitamina D_3	110,2 unidades de pollo por gramo.

---

* Es nombre comercial de una mezcla de Vitaminas de la Cyanamid.

Minerales

Yoduro de Potasio	2 p.p.m.
Sulfato de Hierro	50 p.p.m.
Sulfato de Cobalto	3.0 p.p.m.
Sulfato de Cobre	6.0 p.p.m.
Sal común	1%
Harina de huesos	1%

Cada diez días se hicieron las mezclas de la ración, para evitar la rancidez que podrían ocasionar la copra y el crecebón que contiene harina de soja.

El manejo de animales fue similar en los dos tratamientos. El consumo de alimento y agua fue discrecional, pero se registraron los consumos en el segundo período de alimentación. Además del concentrado se suministraron cuatro Kg. diarios de pasto por animal. La limpieza de los comederos y las cámaras se hizo a las 6 A.M. y 3 P.M. Cada fin de semana (sábado) se pesaban a los animales.

Durante diez diás fueron entrenados los toretes a saltar sobre un novillo. Para determinar la edad de madurez sexual, se computaron los días entre el nacimiento y el primer semen obtenido con espermatozoides móviles.

Cada día se recolectó semen de dos toretes, uno de cámara climática y otro de ambiente natural. En el noveno día se obtuvieron saltos de 2 toretes de cámara climática, debido a que hubo 10 toretes en este tratamiento y 8 en ambiente natural. El intervalo entre saltos fue de nueve días. Se recolectaron solo cinco eyaculaciones de cada animal.

El semen fue colectado por medio de la vagina artificial con temperatura de 41-45ºC. Inmediatamente obtenido el semen, se procedió a hacer las pruebas de semen a temperatura ambiente. Si hubo contaminación del semen no se hizo ninguna prueba.

Examen de las características del semen. Motilidad: La motilidad se examinó en microscopio con aumento de 15 x 10. Para esta prueba se dejó caer en un portaobjeto una gota de semen la que se cubrió con un cubreobjeto Nº 2. La calificación de la motilidad se hizo de acuerdo con una escala de 0 a 100%.

Color: En las muestras de semen se diferenciaron tres colores: cremoso, lechoso y aguanoso.

pH: El pH se determinó utilizando un vaso de precipitado de 5 cc. con fondo de 2 cm. de diámetro. Las lecturas de pH, se hicieron en la escala de un potenciómetro Beckman tipo G con electrodos de vidrio.

Reducción del azul de metileno: Se utilizó solución de 50 mg. de azul de metileno en 100 cc. de solución tampon de citrato de sodio. Se sometieron a la prueba de reducción muestras de semen en que previamente se determinó la motilidad. A 0.5 cc. de semen sin diluir, en tubo de ensayo de 6 cc. se agregó 0.1 cc. de solución de azul de metileno. Esta mezcla se homogenizó con movimientos suaves y se aisló con una capa de aceite mineral para evitar la difusión del aire que pudo haber tenido efecto en el tiempo de reducción. El tiempo de reducción en minutos se promedió por tratamientos.

Prueba de resazurina: Para esta prueba se utilizaron 0.3 cc. de solución de Resazurina (11 mg. de Resazurina en 600 cc. de solución tampon de fosfato de sodio) y 0.2 cc. de semen sin diluir. Se mezcló

la muestra e indicador, y se aisló del ambiente con aceite mineral. Se registró el tiempo en minutos que tardó la mezcla en cambiar el color azul a rosa. Se promedió por tratamientos.

Concentración (por mm^3): Las cuentas de espermatozoides se hicieron por medio del hemocitómetro modelo Thoma-Kammer. De acuerdo con la concentración observada al examinar la motilidad, se utilizó la pipeta para glóbulos rojos o blancos (1, 3, 9, 29, 36, 56). Las diluciones en la pipeta para glóbulos rojos fueron de 1:100 y 1:200 y en la de glóbulos blancos, 1:20. La solución diluyente contenía 3% de cloruro de sodio (NaCl Q.P.) en agua destilada y 5-10 gotas de colorante eosina-azul de anilina en fosfato tampon (ver página 21). Para tomar la muestra, se tuvo el cuidado de homogenizar el semen en el tubo colector. Las cuentas se hicieron en microscopio con 6.3 x 10 aumentos, en 80 cuadrados pequeños de la cámara del hemocitómetro. Se tuvo el cuidado de hacer las cuentas en cuadrados tomados al azar para todos los toretes. La concentración se calculó con la siguiente fórmula:

$$X = \frac{N \times 4.000 \times D}{80} = \text{Espermatozoides X } mm^3$$

N = Número de espermatozoides contados con 80 cuadrados

D = Dilución por uso de pipeta.

Espermatozoides vivos y muertos (%): Se determinaron por teñido diferencial, considerando espermatozoides muertos los que se tiñeron, y vivos, a los no teñidos. Para esto, se utilizó el método eosina-azul de anilina (31, 36, 49). Las proporciones de las soluciones madres fueron las siguientes:

a) Solución tampon M/8 Na_2HPO_4 (15.12 g. en 1000 cc. de agua destilada).

b) Solución tampon M/8 KH_2PO_4 (17.009 g. en 1000 cc. de agua destilada).

El colorante se preparó de la siguiente manera: Se tomaron 80.4 cc. de la solución a, 19.6 cc. de la solución b. De 100 cc. que tiene esta mezcla se quitaron 5 cc. A los 95 cc. restantes se agregó un gramo de eosina y cuatro gramos de azul de anilina. La técnica para la preparación de frotis fue la siguiente:

En un portaobjeto limpio, se dejaron caer 2 a 3 gotas del colorante y sobre este, una ó dos gotas de semen (según la concentración) recolectado en las mejores condiciones de higiene. Se mezclaron colorante y semen con movimientos circulares, utilizando una varilla de vidrio con extremo esférico. Luego se deslizó en ángulo sobre el portaobjeto que contenía la muestra el filo de otro portaobjeto, dejando una lámina muy delgada. Inmediatamente hecho el frotis se secó a 120ºF. Las cuentas se hicieron con microscopio de 300 aumentos. Los porcentajes de espermatozoides vivos y muertos se dedujeron de 300 espermatozoides contados. Se calcularon promedios para los tratamientos de cámara climática y ambiente natural.

Conformación de espermatozoides (%): Se dio el nombre de espermatozoides anormales, a los de dos cabezas, dos colas, cola en espiral, cola torcida, a los sin cola, a los de cabeza alargada o piriforme o con gotas citoplasmáticas.

Los espermatozoides normales y anormales se observaron en las placas que sirvieron para contar espermatozoides vivos y muertos. Se utilizó el microscopio con 300 aumentos para estas cuentas. La conformación de espermatozoides se clasificó en vivos y muertos por separado.

Sacrificio de los animales: Veinte días después de la quinta eyaculación se sacrificaron catorce toros, siete de cámara climática y siete de ambiente natural. Cuatro toretes quedaron para una prueba de recuperación. Se sacrificaron por medio de un golpe de martillo en el punto de intersección de dos líneas imaginarias trazadas de un cuerpo al ojo del lado opuesto. Los golpes tuvieron la finalidad de evitar contracciones musculares que pudieran causar emisiones de semen. Para sangrar el animal, se cortó la vena yugular y la arteria carótida.

El órgano genital completo y la glándula tiroides se extrajeron pocos minutos después de abierto el tórax y abdomen. Para evitar la deshidratación y descomposición se llevaron a un refrigerador en una bolsa de plástico. Aproximadamente a los treinta minutos del sacrificio se seccionó el órgano en sus partes componentes eliminando tejidos extraños. Se tuvo el cuidado de que fuese la misma persona la que realizara este trabajo. Esto tiene importancia en la exactitud de cortes y medidas. Durante el proceso de disección, el órgano se mantuvo sobre papel toalla húmedo, para evitar deshidratación. Se tomó el peso en gramos y volumen en cc. por desplazamiento de la solución acuosa de .9% de NaCl Q.P., en una probeta graduada de 1000 cc. Cada segmento del órgano se maceró en 100 cc. de solución isotónica de NaCl Q.P. en agua destilada. Se llevó a un refrigerador, a 5ºC.

Medida directa de espermatozoides en reserva gonadal y epidídimo: Para medir las reservas, se utilizó la técnica de Amann y Almquist y Almquist y Amann (1, 3). La liberación de espermatozoides del testículo y de la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo, derecho e izquierdo, se hizo por separado. Para esto se utilizó una licuadora

Serval Omni Mixer de 16.000 R.P.M. y solución acuosa estéril de 0.9% de cloruro de sodio. No se utilizó ninguna substancia para retardar la multiplicación bacteriana y descomposición.

Liberación de espermatozoides del testículo: La operación inicial para este fin fue quitar la túnica albugínea, cuidando de que no fueran adheridas a ésta tejidos testiculares. Se hicieron cortes de testículo para formar trozos de 1-3 $cm.^3$ los que se introdujeron en el vaso de la licuadora con 100 cc. de solución .9% de cloruro de sodio, en que el testículo se maceró. Se molió durante un minuto; se añadieron 200-300 cc. de solución de cloruro de sodio y se molió otro minuto final. Con cantidades medidas de la solución de cloruro de sodio, se lavó el vaso de la licuadora varias veces. Se procedió así, para evitar pérdidas de espermatozoides adheridos a la pared del vaso. El volumen final de la suspensión de testículo fue de 1000-1200 cc. que fue la dilución apropiada para las cuentas de espermatozoides.

Liberación de espermatozoides en el epidídimo: Para evitar pérdidas de espermatozoides al quitar el tejido conectivo del saco epidídimal, se molieron los epidídimos incluyendo este tejido. Al igual que para el testículo se hicieron cortes en trozos para facilitar la molienda. La cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo se maceraron en 100 cc. de solución de cloruro de sodio. Con este volumen, se procedió a moler. El volumen final de la suspensión de segmentos de epidídimo, después del molido, fue aproximadamente de 250-300 cc.

Cuenta de espermatozoides en el testículo y epidídimo: Los espermatozoides presentes en las suspensiones fueron contados el mismo día del sacrificio e inmediatamente después de la molienda. Usando

microscopio con 300 aumentos, se contaron en un hemocitómetro modelo Thoma-Kammer (Alemán). Las cuentas se hicieron en 80 cuadrados pequeños de la cámara del hemocitómetro. Cada cuadrado pequeño tiene 0,00025 $mm.^3$ de volumen. En 80 cuadrados, el volumen es 0.02 $mm.^3$ De esta manera, el número de espermatozoides contados fue en 0.02 $mm.^3$ Para la deducción total de espermatozoides del testículo y epidídimo, se calculó la siguiente fórmula:

$$N^{\underline{o}} = \frac{N \times \text{sol. final}}{0.02} = 50 \times N \times \text{solución final} \quad (A)$$

N = número de espermatozoides contados en 80 cuadrados.

En el cálculo de espermatozoides liberados del testículo se hicieron correcciones de volumen. Debido a que el volumen testicular fue tomado incluyendo la túnica albugínea y el molido sin la túnica. Además, de cada testículo se extrajeron 2-3 $cm.^3$ de testículo para observar estados de la espermatogenesis por medio de preparaciones histológicas. Por ejemplo, si el volumen del testículo con túnica fue 160 $cm.^3$ la túnica sola 10 $cm.^3$ y la muestra para placas 3 $cm.^3$, el volumen final del testículo para el molido fue 147 $cm.^3$ Si en el hemocitómetro se contaron 60 espermatozoides con aplicación de la fórmula A, se tendrán 3.441×10^9 espermatozoides por 147 $cm.^3$ o 149 g. de testículo (Pe = 1.02)*. Calculando el número de espermatozoides por gramo de testículo, se tienen 23.093×10^6. Multiplicando esta cifra por 3.1 se tiene el número aproximado de espermatozoides contenido en la muestra para preparaciones histológicas. Añadiendo 71.588×10^6 de la muestra a

---

* Peso específico calculado con datos de este trabajo.

3.441×10^9 se tiene el número total de espermatozoides por testículo (3.512×10^9).

En las cuentas de epidídimo, el número de espermatozoides por volumen o peso total se encontró directamente, utilizando las lecturas del hemocitómetro y la fórmula A.

Preparaciones histológicas de testículo y lectura de fases de la espermatogenesis: Las secciones de testículo fueron fijadas en solución Zenker-formol (17), que tiene los siguientes ingredientes:

$HgCl_2$	5.0 gramos
K_2CrO_7	2.5 gramos
agua destilada	100 cc.

Se pusieron 10 cc. de esta solución en un frasco de infiltración, al que se añadió un cc. de formalina (37-40% formaldheido) antes de poner en contacto la solución y la muestra. La fijación fue de 12-15 horas de duración. Para la infiltración en parafina, se siguió el siguiente esquema:

Infiltración de muestras de testículo en parafina

Zenker-Formol
12-15 horas

↓

Agua corriente
2 horas

↓

Agua destilada
2 horas

↓

Etanol 30%
12 horas

↓

Etanol 50%
12 horas

↓

Etanol 70%
12 horas

↓

Etanol 95%
12 horas

↓

Etanol absoluto
12 horas

↓

Etanol absoluto 80%, xilol 20%
12 horas

↓

Etanol absoluto 50%, xilol 50%
12 horas

↓

Etanol absoluto 20%, xilol 80%
12 horas

↑

Xilol 100%
12 horas

↑

Xilol 50%, parafina 50%
12 horas

↑

Xilol 20%, parafina 80%
12 horas

↑

Parafina 100%
12 horas

↑

Parafina 100%
12 horas

↑

Parafina 50%, tissuemat 50%
12 horas

↑

Parafina 20%, tissuemat 80%
12 horas

↑

Tissuemat 100%
12 horas

↑

Empotrado de muestras en moldes
de papel

Las muestras se cortaron a ocho micras de espesor, utilizando micrótomo. La cuchilla del micrótomo se substituyó con hojas "Gillete azul". Estos cortes se montaron en portaobjetos, utilizando la solución adhesiva de Mayer (26) que tiene la siguiente fórmula:

Albúmina de huevo	5 cc.
Glicerina	50 cc.
Salicilato de sodio	1 gramo

A 5 cc. de la anterior solución, se añadieron 185 cc. de agua destilada y 10 cc. de formalina.

Para teñir el tejido testicular, se utilizó un colorante específico para cromosomas, por el método de Reacción de Feulgen (40). Esta reacción se realizó con dos soluciones A y B. Las proporciones de estas soluciones se detallan a continuación (26):

Solución A		Solución B
0.5 g.	Fucsina básica	10 cc. bisulfito de sodio al 10% en agua destilada
100 cc.	agua destilada 80-90ºC.	20 cc. HCl 1 N.
10 cc.	HCl 1 N	170 cc. agua destilada
0.5 g.	metabisulfito de sodio	

Los pasos seguidos para el coloreo, y preparación permanente de las placas se resumen en el esquema que sigue:

Esquema para colorear tejido testicular

Placa con muestra en parafina
↓
Xilol (desparafinado)
↓
Etanol absoluto
2 minutos
↓
Etanol 95%
2 minutos
↓
Etanol 70%
2 minutos
↓
Etanol 50%
2 minutos
↓
Etanol 30%
2 minutos
↓
Agua destilada
2 minutos
↓
H Cl. frío
4 minutos
↓
H Cl. caliente 60ºC.
4 minutos
↓
H Cl. frío
4 minutos
↓
Agua de grifo
5-10 minutos
↓
Colorante (Solución A)
4-5 horas
↓
Solución B I.
5 minutos
↓
Solución B II.
5 minutos
↑
Solución B III.
5 minutos
↑
Agua de grifo
5-10 minutos
↑
Etanol 30%
2 minutos
↑
Etanol 50%
2 minutos
↑
Etanol 70%
2 minutos
↑
Etanol 95%
2 minutos
↑
Etanol absoluto I.
2 minutos
↑
Etanol absoluto II.
2 minutos
↑
Fenol-xilol
2 minutos
↑
Xilol I.
2 minutos
↑
Xilol II.
2 minutos
↑
Xilol III.
2 minutos
↑
Resina y cubreobjeto

Los estados del ciclo espermatogenético de los tubos seminíferos se contaron, utilizando una modificación del método de Ortavant (40). A los ocho estados determinados por Ortavant, se añadieron seis estados diferentes por apariencia y número de divisiones de las células del epitelio germinal. Estos seis estados son los siguientes:

a. Tubos con una división del espermatogonio A.

b. Con 2-3 divisiones de espermatogonios

c. Sin división, con muchos espermatogonios tipo A.

d. Sin división con algunos espermatogonios A.

e. Tubos desordenados. El aspecto de este estado fue una mezcla de todas las células, no existe secuencia en las divisiones.

f. Con tres divisiones, presencia de espermatogonios tipo B y algunas espermátidas.

Análisis estadístico: Los datos obtenidos de las características de semen, se promediaron por tratamientos. No se hizo ningún análisis estadístico, porque las diferencias son obvias.

Se hizo análisis de variancia entre: pesos al sacrificio, peso en canal, edad y peso al primer salto.

Para determinar si existen diferencias entre datos de las medidas de los segmentos del órgano genital, se hicieron pruebas de t, entre:

- El peso del testículo izquierdo y derecho.
- El volumen del testículo izquierdo y derecho.
- El peso de la cabeza del epidídimo izquierdo y derecho.
- El peso del cuerpo del epidídimo izquierdo y derecho.
- El peso de la cola del epidídimo izquierdo y derecho.
- El peso del conducto diferente izquierdo y derecho.

- El peso de la vesícula seminal izquierda y derecha.
- El peso de la ampulla izquierda y derecha.
- El peso de la túnica albugínea del testículo izquierdo y la del derecho.
- La producción de espermatozoides por el testículo izquierdo y derecho.
- El contenido de espermatozoides en la cabeza del epidídimo izquierdo y derecho.
- El contenido de espermatozoides en el cuerpo del epidídimo izquierdo y derecho.
- El contenido de espermatozoides en la cola del epidídimo izquierdo y derecho.

Al no encontrar diferencias entre estas medidas, se hicieron pruebas de t, por tratamientos, utilizando las mismas medidas. Con los pesos de la glándula tiroides y el porcentaje, que es el testículo con respecto al peso en canal, se probaron diferencias entre tratamientos por prueba de t.

Se hicieron correlaciones entre: El peso en canal y peso del testículo, entre pH y concentración. Peso de testículo y producción de semen, edad y peso del animal en la primera eyaculación y entre el peso del testículo y número de espermatozoides en reserva del testículo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los diez animales de cámara climática (100%) y siete de ambiente natural (87.5%), respondieron favorablemente al entrenamiento para el salto sobre el novillo. Observando estos resultados se cree que el tratamiento con altas temperaturas no tuvo efecto en las células intersticiales. Estas son las que producen testosterona y que determinan el interés sexual. Sin embargo, Casady y colaboradores (15) y Dutt (20), afirman que las altas temperaturas disminuyen la líbido en toros.

Los toretes de cámara climática desarrollaron normalmente el instinto genésico. Pero la presencia de espermatozoides en la eyaculación fue esporádico.

El 60% de animales de ambiente cálido húmedo y el 100% de los que mostraron líbido del ambiente natural produjeron semen con espermatozoides.

En los animales criados en ambiente natural se ha notado una tendencia marcada a mejores características en todas las observaciones, excepto pesos en canal y al sacrificio. Haciendo énfasis en las condiciones de clima impuestas, los animales de cámara climática mostraron ser perjudicados en su capacidad reproductiva.

Se observa en el conjunto de la prueba que no tuvieron influencia los aumentos de peso en la producción de semen. El análisis de la variancia con pesos al sacrificio y en canal, muestra que el tratamiento no fue benéfico ni perjudicial en el desarrollo corporal (ver Cuadro 1).

Baker et.al. (6) sostienen que la edad y el peso están estrechamente correlacionados. En el presente trabajo no se encontró una correlación que estadísticamente pueda tener significancia. Un factor

Cuadro 1. Análisis de variancia con pesos al sacrificio, en canal, pesos y edad al primer salto. (Kg. y semanas).

Tratamientos	Promedio peso sacrificio	Promedio peso en canal	Promedio peso primer salto	Promedio edad primer salto
Cámara climática	220.5 N.S.	99.9 N.S.	171.4 N.S.	54.9 *
Ambiente natural	224.2	101.7	182.1	48.4

que puede estar perturbando la lectura clara de los resultados, es el número pequeño de observaciones. Para obviar este inconveniente se calculó 14.88% de asociación entre peso y edad. Bratton et. al. (14) encontraron que el peso del animal es el que determina la edad de la pubertad. Mientras que Flipso (23), de una prueba experimental, informa que la nutrición es el factor que interviene en modificar la influencia de la edad. Estos resultados parecen ser inconsistentes, debido a que no encontró significación estadística en producción de semen. Los animales alimentados con ensilaje de maíz (2.2% P.D.) produjeron semen a menor peso y menor edad que los alimentados con concentrado (16% P.D.).

Los promedios de pesos al primer salto con espermatozoides, en esta prueba fueron 171.4 y 182.1 Kg. para los animales de cámara climática y ambiente natural respectivamente. En base a este resultado se afirma que el peso corporal de animales de ambiente cálido húmedo no interviene en la capacidad espermatogenética del testículo (Cuadro 1).

La edad al primer salto con espermatozoides móviles fue de 54.9 y 48.4 semanas, en animales de cámara climática y ambiente natural respectivamente. La diferencia de 6.5 semanas fue significativa al nivel de 5% de probabilidades.

Con dos criterios (edad y peso) se afirma definitivamente para este experimento, que toretes expuestos a temperatura elevada produjeron espermatozoides a mayor edad y pesos iguales comparados con animales de ambiente natural.

En la literatura se encuentra numerosos informes de que la temperatura tiene influencia sobre la espermatogénesis. Pero todos los trabajos realizados fueron con animales adultos de conocida actividad espermatogenética (5, 15, 20, 21, 27, 37, 38, 40, 44, 50, 51, 58). En el presente trabajo se informa sobre las observaciones de semen de toretes que crecieron desde la edad del destete hasta la pubertad en condiciones de alta temperatura y humedad. Se suponía que expuestos a temperatura durante 303 días los animales se adaptarían y que sus funciones fisiológicas se cumplirían normalmente. Pero con pruebas de las características de semen se encontraron resultados opuestos. La variación entre tratamientos en volumen eyaculado fue insignificante. Este resultado concuerda con los resultados de Dutt y Ham (21) en morueeos a 90ºF. Sin embargo, Sukla (50) en cabras, y Hafoz y colaboradores (29) en moruecos, determinaron diferencias en volumen eyaculado en la estación más caliente del año.

Examinando los datos de las observaciones en este experimento, los promedios de motilidad inicial fueron de 4.08 y 41.57% en el semen de toretes de cámara climática y ambiente natural respectivamente. De acuerdo con los límites de Mercier y Salisbury (37), estos promedios

son bajos. Ellos llaman semen deficiente cuando tiene menos de 70% de motilidad. Pero se nota marcada diferencia entre tratamientos. Hubo incremento de la motilidad en ambos tratamientos a medida que aumenta el número de eyaculaciones. La velocidad de incremento fue mayor en el semen de toretes de ambiente natural. Además, tres toretes de este tratamiento produjeron semen con 75% de motilidad en la cuarta y quinta eyaculación. Mientras que en toretes de cámara climática la máxima motilidad observada fue de 20% en un solo animal. Pero en sucesivas eyaculaciones nuevamente bajó su motilidad a 0%. Los coeficientes de regresión para motilidad y número de eyaculaciones fueron de 1.6×10^4 y 7.8×10^4 para toretes de cámara climática y cambiente natural respectivamente.

La concentración de espermatozoides entre individuos fue diferente en ambos tratamientos. El promedio de las cinco eyaculaciones fue de 9.21×10^4 espermatozoides en cámara climática ($3.38-19.88 \times 10^4$) y 92.78×10^4 ($50.00-123.60 \times 10^4$) espermatozoides por mm^3. en ambiente natural (Cuadro 2).

Se hizo una correlación con los resultados anteriores y peso del testículo. Para este análisis se agruparon datos de ambos tratamientos. El coeficiente de correlación no llegó al nivel de significancia. Además, el porcentaje de asociación de estos datos fue bajo (26.6%). Las pruebas de t para pesos del testículo entre tratamientos fue significativo al 1%. En el Cuadro 6, se observa que los testículos de toretes de ambiente natural fueron más pesados que en cámara climática (106.0 y 149.4 g.).

Cuadro 2. Características de semen en las cinco eyaculaciones por tratamiento.

	Eyaculaciones					
	1a	2a	3a	4a	5a	Promedio
	Volumen eyaculado en cc.					
Cámara climática	1.3	1.6	1.8	2.1	2.3	1.96
Ambiente natural	1.4	2.0	2.1	1.9	2.5	1.99
	Motilidad (%)					
Cámara climática	.28	.85	5.28	4.40	6.50	4.08
Ambiente natural	18.56	38.57	50.71	46.43	53.57	41.57
	pH.					
Cámara climática	7.12	6.80	6.90	6.90	6.86	6.97
Ambiente natural	6.66	6.86	6.60	6.90	6.90	6.86
	Número de espermatozoides (x 10^4 por mm^3.)					
Cámara climática	3.38	6.90	11.50	4.43	19.88	9.21
Ambiente natural	50.00	69.50	123.60	117.30	103.50	92.78
	Tiempo de reducción del azul de metileno (minutos)					
Cámara climática	-(*)	-	-	-	-	-
Ambiente natural	655	1064	51	51.4	86.8	381.6
	Tiempo de reducción de la resazurina (minutos)					
Cámara climática	-(*)	-	524.2	-	-	-
Ambiente natural	57.1	535	20.1	25.4	21.6	131.8

(*) Significa que no redujeron.

Las ecuaciones de regresión lineal para concentración y número de eyaculaciones fueron: $Y = 3.07 \times 10^4 + 2.05 \times 10^4 X$ é $Y = 52.28 \times 10^4 + 13.5 \times 10^4 X$, para cámara climática y ambiente natural respectivamente. Donde Y es la concentración y X el número de eyaculaciones. El uso de estas ecuaciones tiene sus restricciones porque a cierta edad del animal posiblemente el coeficiente de regresión será nula o una cifra negativa.

Los resultados en concentración de este experimento concuerda con otros estudios hechos para averiguar la influencia de la temperatura en concentración de espermatozoides (15, 20, 29, 37, 38, 40, 44).

Casady et, al. (15), Ortavant (40), Moore (38) y Phillips y McKenzie (44) sostienen que la temperatura ocasiona insuficiencia del epitelio germinal, citólisis, etc. Que es la causa de la baja concentración de espermatozoides en el semen.

Una causa atribuible para la baja concentración de espermatozoides en animales de cámara climática es la pérdida de energía ocasionada por el esfuerzo realizado para compensar excesos de calor por medio de la hiperventilación, transpiración, salivación, etc.

Las muestras de semen de toretes de cámara climática no redujeron el azul de metileno y la resazurina (ver Cuadro 2).

Esta prueba de vitalidad confirma nuevamente la baja concentración y presencia de espermatozoides muertos. Se sabe que el tiempo de reducción del azul de metileno está estrechamente correlacionado con la concentración. El semen para ser considerado como bueno debe reducir el azul de metileno en once minutos como máximo (37). Si el tiempo utilizado por el semen de toretes de ambiente natural no está próximo al límite anterior, fue menor al utilizado por el semen de toretes de cámara climática.

Cuadro 3. Características de los espermatozoides de toretes sometidos a dos ambientes.

	EYACULACIONES									
	1a		2a		3a		4a		5a	
	C*	A*	C	A	C	A	C	A	C	A
				%						
Normales										
Vivos	1.00	24.28	1.33	28.61	8.83	39.52	14.93	40.19	11.03	43.76
Muertos	18.67	16.76	30.67	26.44	32.00	25.05	34.66	20.95	35.91	20.43
Anormales										
Cola-torcida										
Vivos	2.33	20.00	1.00	16.05	1.93	9.90	.60	15.81	2.80	13.95
Muertos	47.00	12.23	45.00	16.55	20.58	17.95	16.53	14.00	17.42	12.19
Sin cola										
Vivos	0.00	5.57	-	2.78	.83	.38	.53	1.29	.50	1.24
Muertos	30.00	7.85	14.00	7.44	30.07	4.09	19.33	4.19	21.83	5.52
Cabeza anormal										
Vivos	1.00	4.66	1.00	.50	.67	1.09	1.13	1.43	1.41	1.24
Muertos	-	4.85	7.00	.83	4.83	1.52	12.00	1.90	8.66	1.52
Gota citoplasmática										
Vivos	-	2.00	-	.83	-	.14	.13	.19	.30	-
Muertos	-	1.76	-	-	.27	.05	-	.05	.33	.14
	100.00	99.96	100.00	100.00	100.00	99.69	99.84	100.00	100.22	100.00

C* = Cámara Climática A* = Ambiente Natural.

Nota.- Las diferencias en mas o en menos para la suma de cien, se debe al cálculo de decimales. Además, en la tercera eyaculación de un torete de ambiente natural excepcionalmente se encontró un espermatozoide con dos cabezas, cuyo porcentaje no está tabulado.

Conformación de espermatozoides, vivos y muertos: En el Cuadro 3, se observan los porcentajes de espermatozoides normales, anormales, vivos y muertos. Hubo muchos tipos de espermatozoides anormales. Los defectos más abundantes fueron espermatozoides sin cola y cola torcida (23.35 y 17.53%).

El 85.53% de los espermatozoides de los toretes de cámara climática estuvieron muertos y 14.47% vivos. Del total de espermatozoides vivos, 26.14% fueron anormales y 73.86% normales.

El 44.37% de espermatozoides del semen de los toretes en ambiente templado estuvieron muertos y 55.62% vivos. El 42.40% de espermatozoides vivos fueron anormales y 57.59% normales.

Analizando los datos de ambos tratamientos se observa que el mayor número de espermatozoides muertos y anormales se registró en animales de cámara climática. El porcentaje de espermatozoides anormales con respecto a espermatozoides vivos en ambos tratamientos tiende a ser menor. Parece lógico afirmar que los espermatozoides anormales terminan muertos en alguna etapa de su vida. Este resultado se puede interpretar en términos de respuesta al tratamiento con temperatura.

Hay mucha evidencia (7, 9, 29, 47), que una temperatura superior a 85ºF es suficiente para incrementar el número de espermatozoides muertos y anormales. Casady et. al. (15) con temperatura de 98.9º y 86.4ºF observaron 72.8 y 70.6% de espermatozoides muertos. En moruecos (29) determinaron que los espermatozoides muertos y anormales en toretes de cámara climática fueron superiores a los hallados por Casady et. al. y Hafez (29). La habilidad para producir semen con espermatozoides normales, vivos y muertos fue diferente entre individuos.

Branton y Salisbury (13) sostienen que el origen de los espermatozoides anormales es el testículo. La existencia de espermatozoides anormales en el semen de toretes tratados con temperatura se debe posiblemente a que el calor influenció directamente al testículo. También se puede atribuir una influencia indirecta a las glándulas de secresión interna que regulan los estados del ciclo espermatogenético. Es probable que la temperatura aumente o disminuya el tiempo en una de las fases de la metamorfosis de la espermátida. Si este tiempo es mayor o menor al ordinario en las fases 4 y 5, el defecto se presentará en la cabeza, porque en estas fases se forman el aparato de Golgi y luego el sistema acrosómico. En la fase 6, las variaciones de tiempo se reflejaría en defectos del filamento axial (cola). Otra suposición es que la presencia o ausencia de alguna substancia de las glándulas accesorias en condiciones de alta temperatura, tiene la facultad de degenerar células (8). Un caso de este tipo es la gota citoplasmática que se presenta en los espermatozoides del epidídimo.

En resumen es evidente que la espermatogénesis fue inhibida en los toretes expuestos a elevada temperatura. Todos los índices utilizados para determinar la calidad del semen fueron deficientes en este grupo.

Los datos muestran que temperaturas de 98ºF tienen un marcado efecto detrimente en las características de semen. Sin embargo, no se pueden hacer predicciones de gran exactitud sobre el efecto en la espermatogénesis de otras temperaturas o menor tiempo de exposición que los usados en este experimento.

Sacrificio de los animales. Medida de los segmentos de los órganos genitales: Los pesos en canal y al sacrificio por tratamientos no fueron estadísticamente diferentes (Cuadro 1). Sin embargo, por pruebas de t, se encontraron diferencias entre las medidas de los segmentos del sistema genital, excepto conducto deferente, ampulla y vesícula seminal. Las pruebas de t están resumidas en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Prueba de t, entre tratamientos con las medidas de los segmentos del sistema genital.

Segmentos	$\bar{X}c$	$\bar{X}a$	$s\bar{x}$	t (a)
	g.	g.		
Testículo	106.0	149.4	9.95	4.362 **
Cabeza del epidídimo	6.24	7.39	.246	4.675 **
Cuerpo del epidídimo	1.29	1.57	.082	3.415 **
Cola del epidídimo	4.07	4.69	.248	2.500 *
Ductus deferent	1.34	1.31	.099	.301 N.S.
Ampulla	4.40	4.34	.914	.066 N.S.
Vesícula seminal	14.70	13.70	1.007	.993 N.S.
Túnica albugínea (o)	10.32	7.93	.758	3.153 **
% testículo con respecto al peso en canal	.212	.295	.028	2.912 *
Volumen testículo cc.	105.1	147.3	9.15	4.612 **

(a) 5 G. L.

(o) El peso de la túnica albugínea, se calculó por 100 g. de testículo.

$\bar{X}c$ Promedios del tratamiento cámara climática.

$\bar{X}a$ Promedios del tratamiento ambiente natural.

$s\bar{x}$ Error estandard.

En las medidas de los segmentos del sistema genital, hubo diferencias entre individuos del mismo tratamiento. El Cuadro 4, demuestra que las diferencias entre tratamientos fueron más pronunciadas. Las mayores diferencias se registraron en el testículo. Para evitar la influencia del peso corporal en el peso del testículo, se calculó el porcentaje del testículo con respecto al peso en canal. Con los resultados de este cálculo, se afirma que los pesos del testículo por 100 Kg. en canal fue menor en animales de cámara climática que en ambiente natural. El testículo derecho de toretes en cámara climática fue 7.3 g. más pesado que el izquierdo. En ambiente natural el testículo izquierdo 7.4 g. más pesado que el derecho. Con pruebas de t, dentro de tratamientos, las diferencias en peso no llegaron al nivel de significancia. Sin embargo, al comparar los pesos testiculares entre cámara climática y ambiente natural, la diferencia fue significativa al nivel de 1%. Almquist y Amann (1), encontraron 8.1 g. más pesado el testículo izquierdo que el derecho en ambiente natural. Esta diferencia fue significativa al 1%.

Medida de las reservas de espermatozoides en testículos y epidídimos: Hubo diferencia significativa entre tratamientos en el peso del testículo y espermatozoides en reserva gonadal y extragonadal (Cuadros 4 y 5).

En este trabajo, las cuentas se hicieron unicamente de espermatozoides bien diferenciados. Almquist y Amann (1) contaron como reservas gonadales los espermatozoides y espermátidas (fases VI-VII de los tubos). En toros de 2-12 años de edad (1), obtuvieron 54.8 millones de espermatozoides por gramo de testículo (20.2 billones por cada

testículo). Amann y Almquist (3), en otro trabajo similar con toros de la misma edad encontraron 72.6 billones de espermatozoides en ambos testículos (54.8 millones por gramo de testículo). Analizando los resultados de estos investigadores se observa que el número promedio de espermatozoides por testículo fue diferente, pero fue similar el número de espermatozoides por gramo de testículo. Esto sugiere que por unidad de peso testicular o superficie del epitelio germinal el número de espermatozoides producidos es constante.

En el presente experimento se utilizaron toretes con una edad aproximada de 51.6 semanas al momento del sacrificio. Las reservas de ambos testículos fueron de 6.53 y 19.65 billones de espermatozoides en animales de cámara climática y ambiente natural respectivamente, como se observa en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Número promedio de espermatozoides en reserva testicular y epidídimo (sumados derecho e izquierdo).

Tratamientos	Testículo $x\ 10^9$	Por g. de testículo $x\ 10^6$	Epidídimo		
			Cabeza $x\ 10^8$	Cuerpo $x\ 10^8$	Cola $x\ 10^8$
Cámara climática	6.53	31.71	8.64	3.12	14.87
Ambiente natural	19.65	66.66	40.24	9.27	52.91

Las diferencias entre tratamientos para las reservas de espermatozoides en el testículo fueron diferentes al nivel de 1% (Cuadro 6).

El número de espermatozoides contados en el testículo es inferior al determinado por Almquist y Amann (1) y Amann y Almquist (3). Esta

diferencia se debe a que los animales de este experimento fueron de menor edad y los testículos no completaron su desarrollo. Los datos de peso testicular obtenidos en este experimento (127.5 g.) fueron menores a los encontrados por Almquist y Amann (374.0 g.).

El número de espermatozoides contados por gramo de testículo en este trabajo es mayor a los hallados por los autores citados anteriormente. Este mayor número se observa en animales de ambiente natural, 66.66 billones por gramo de testículo. En cámara climática fue de 31.71 millones por gramo de testículo. Con los resultados anteriores se puede afirmar que la eficiencia del epitelio germinal en toretes de ambiente natural fue mayor que en cámara climática. Comparando los datos de Almquist y Amann (1) con los datos de toretes de ambiente natural, se sostiene que el testículo de animales jóvenes tiene mayor capacidad de producir espermatozoides que los toros viejos.

Para poner de manifiesto, el efecto depresor de la temperatura en la cantidad de espermatozoides producidos, se encontró 0.13-7.8 billones de intervalo en animales de cámara climática y 3.58-17.52 billones en ambiente natural.

En el Cuadro 6 se observa la diferencia estadística de 1% para el número de espermatozoides en reserva gonadal por tratamientos. La menor concentración de espermatozoides en toretes de cámara climática resultó probablemente por la deficiente espermatocitogénesis en los tubos.

Cuadro 6. Prueba de t, con número de espermatozoides en reserva testicular y epidídimo (promedio derecho e izquierdo).

	$\bar{X}c$	$\bar{X}a$	$s\bar{x}$	t (a)
Testículo x 10^9	3.33	9.23	1.280	4.609 **
Por g. de testículo x 10^6	31.71	66.66	2.876	12.041 **
Epidídimo x 10^8				
Cabeza	4.32	20.12	1.890	8.359 **
Cuerpo	1.56	4.64	1.090	2.826 *
Cola	7.43	26.45	4.360	4.362 **

(a) 5 G. L.
$\bar{X}c$ Promedio de cámara climática.
$\bar{X}a$ Promedio de ambiente natural.
$s\bar{x}$ Error estandard.

Young (59), Turner (51) y Ortavant (40) sostienen que las células más avanzadas que el espermatogonio son las primeras células perjudicadas por la temperatura. Es lógico pensar que si esto se cumple menor será la concentración de espermatozoides en reserva gonadal. Este efecto, en el presente trabajo se confirmó por medio de las observaciones de las fases de la espermatogénesis. Con cuentas de las reservas testiculares en animales de cámara climática, se detectaron la presencia de espermatozoides, aunque en menor cantidad que los de ambiente natural. Uno de los animales que más espermatozoides presentó en reserva gonadal no presentó ninguno en el semen eyaculado. Se puede hacer la pregunta, cual será el mecanismo influenciado por

la temperatura, por lo que el espermatozoide no emigra al exterior?. Hay tres posibles respuestas pero sin ninguna base cierta:

1. Que los espermatozoides en los tubos se reabsorben, pero, a medida que se realizan las divisiones y maduran las espermátidas, por el número elevado de espermatozoides y la presión entre ellos, hace que emigren de los tubos.
2. Que los espermatozoides se reabsorben en el epidídimo, pero esta reabsorción solo se realiza en condiciones de alta producción de espermatozoides y baja frecuencia de eyaculaciones.
3. Que existe algún mecanismo influenciado por la temperatura que obstruya el conducto deferente o parte de los tubos rectos.

En el Cuadro 5, se observa el número de espermatozoides por cada segmento de epidídimo y por tratamientos.

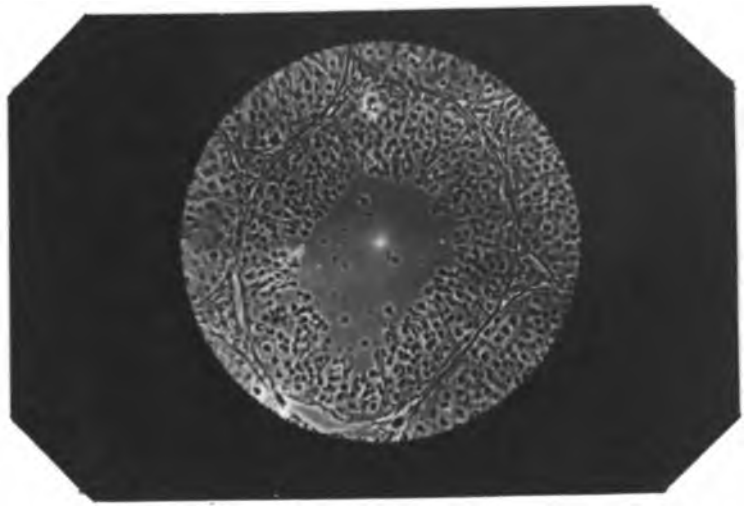
El contenido de espermatozoides en el epidídimo de toretes de cámara climática fue de 26.63 x 10^8. Del total de espermatozoides contados el 32.44, 11.72 y 55.84% fueron de la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo. En toretes de ambiente templado se encontraron 102.42 x 10^8 espermatozoides. El 39.29, 9.05 y 51.66% fueron de la cabeza, el cuerpo y la cola respectivamente. En los animales de cámara climática se contó 25.97% de espermatozoides con respecto al 100% de espermatozoides contados en los animales de ambiente natural.

Bialy y Smith (9), por medio de lavados con solución isotónica de citrato de sodio encontraron que 36.24, 18.34 y 45.42% de espermatozoides estuvieron contenidos en la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo. Comparando los resultados de este experimento y los de Bialy y Smith (9), se nota que la cola del epidídimo tuvo más

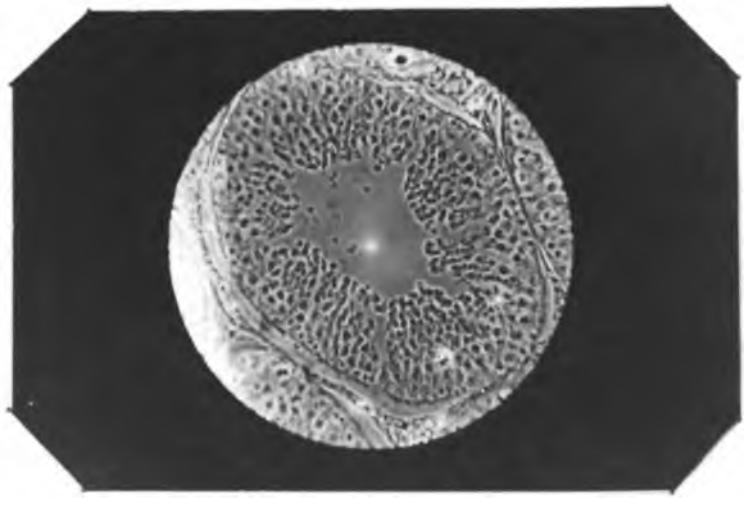
espermatozoides que la cabeza y esta más que el cuerpo. El contenido de espermatozoides en reserva del epidídimo fue superior en animales entre individuos fue insignificante. Pero la diferencia entre tratamientos fue estadísticamente significativa al nivel de 1%, excepto entre el cuerpo del epidídimo que fue diferente al 5%.

La concentración de espermatozoides en el epidídimo depende de la intensidad de la producción de espermatozoides y la frecuencia de eyaculaciones. Todos los animales de este experimento tuvieron similar manejo para determinar estas reservas excepto tratamientos. Si hubo diferencia en el número de espermatozoides en el epidídimo, se asume que el tratamiento con altas temperaturas influenció en la actividad espermatogenésica del testículo. Si esta actividad es baja lógicamente la cantidad de espermatozoides en reserva del epidídimo será menor, porque el epidídimo solo tiene la finalidad de almacenar los espermatozoides producidos.

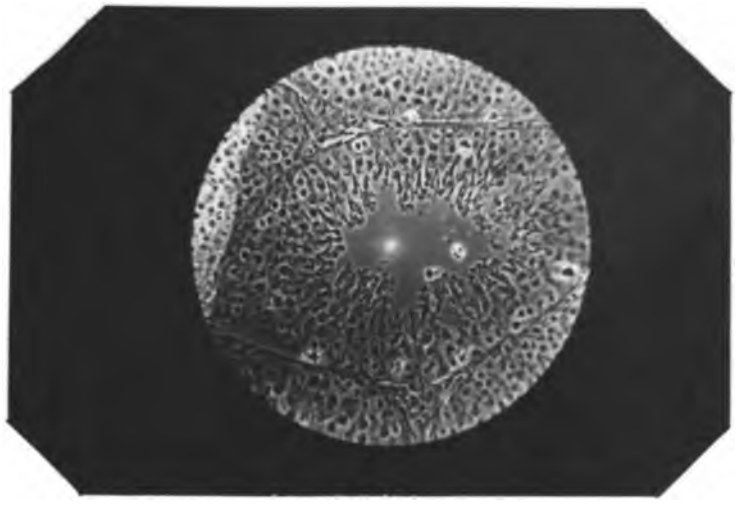
Estados de la espermatogénesis en toretes de ambiente natural: En este grupo se identificaron los ocho estados. Pero las frecuencias no concuerdan con los encontrados en el toro por Ortavant (40). Las frecuencias de los estados registrados en los animales de este grupo se aproximan a las determinadas en moruecos. El porcentaje medio de los primeros tres estados fue de 48.24, en el cuarto 13.12 y en los cuatro últimos 38.61%, (ver Cuadro 7 y figuras de las páginas 47, 48, 49 y 50).



Estado 1.



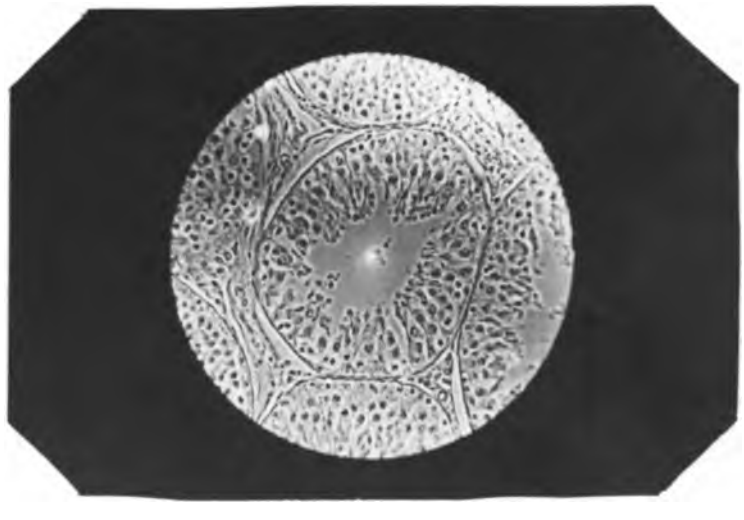
Estado 2.



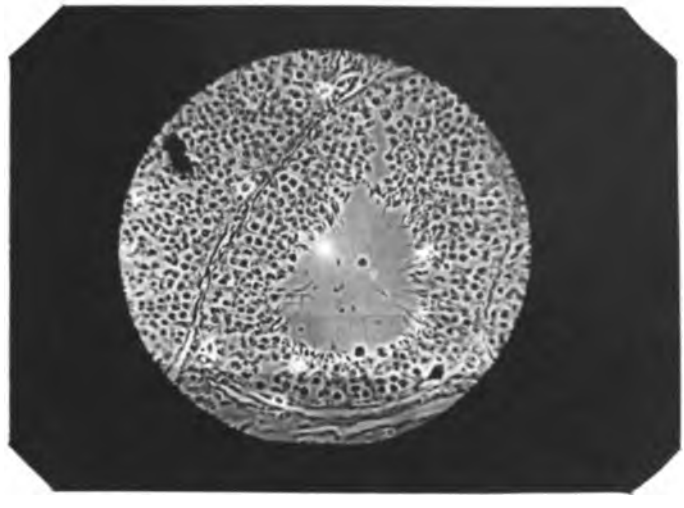
Estado 3.

Estado 4.

Estado 5.



Estado 6.



Estado 7.

Estado 8.

Cuadro 7. Estados de la espermatogenesis.

Estados	Cámara climática (6) ✱		Ambiente natural (4) ✱		Observaciones
1	4.7	12.3	17.9	48.3	
2	2.8		12.9		
3	4.8		17.5		
4	3.3		13.1		
5	2.3	12.7	4.1	38.6	
6	3.7		10.6		
7	3.7		13.5		
8	3.0		10.4		
a	11.5	71.66	-		Tubos con una sola división
b	16.8		-		Tubos con 2-3 divisiones
c	22.9		-		Tubos sin división con muchas (spg. espermatogonias A.
d	6.2		-		Tubos sin división con algunas espermatogonias A.
e	8.0		-		Tubos desordenados
f	6.2		-		Tubos con 3 divisiones, hay presencia de espermatogonias B y algunas espermátidas.

(✱) Número de animales por tratamiento.

Observando las frecuencias de los estados del ciclo por individuos se nota que es casi constante. Las desviaciones en las frecuencias posiblemente se deben a la inexperiencia en la identificación o a la individualidad de los animales. El estado 1, fue el más frecuente y el estado 5, el menos frecuente. Según Ortavant (40), la mayor frecuencia se presenta en el estado 1. La diferencia en las frecuencias determinadas por Ortavant y este trabajo, posiblemente es causada por el incompleto desarrollo de la actividad de los testículos de animales jóvenes.

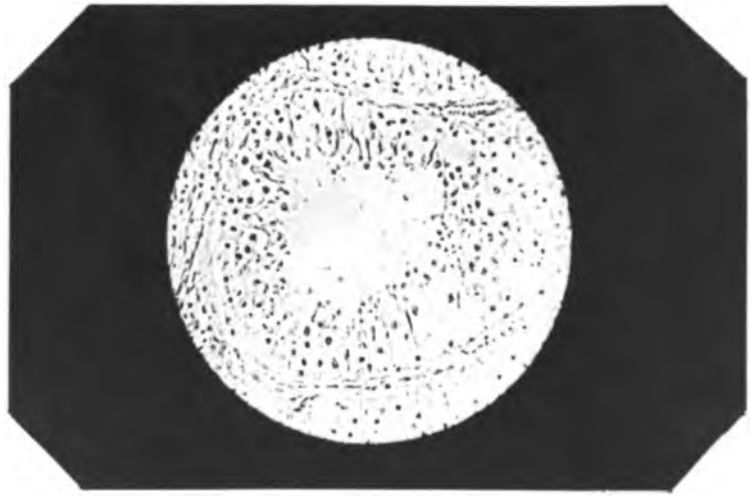
Sin embargo, también se puede pensar en la influencia de la temperatura ambiente, natural de Turrialba que es mayor al lugar de origen de los animales de este experimento.

Estados de la espermatogénesis en los toretes del grupo cámara climática: En el Cuadro 7 y las figuras de las páginas 53, 54 y 55), se presentan los porcentajes de los estados de la espermatogénesis en animales de este grupo. Comparando las frecuencias de este grupo con los de ambiente natural se observa marcada diferencia.

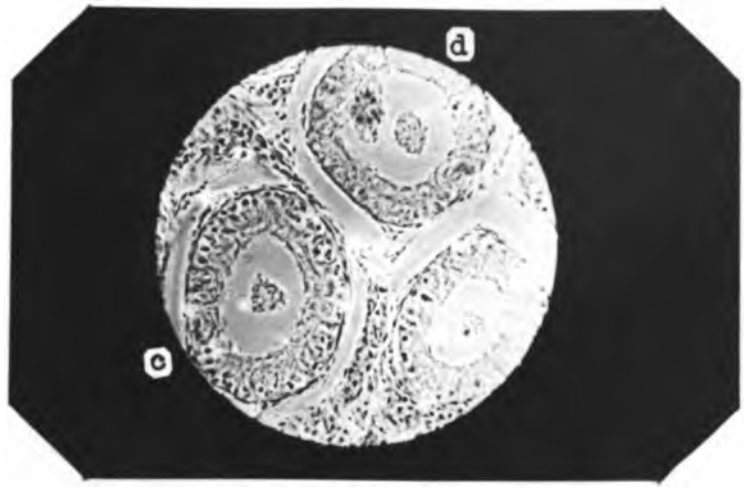
Para las observaciones de este grupo se añadieron seis estados diferentes a los estados descritos por Ortavant (40). En este trabajo se encontró que el 71.7 % de los tubos presentaron células que no completaron sus divisiones para llegar a la fase 8. El porcentaje de los tubos con apariencia similar a las fases descritas por Ortavant, fue de 28.3%.

Los resultados están de acuerdo con las afirmaciones de Young (59), Ortavant (40) y Turner (51). Ellos sostienen que las primeras células perjudicadas por el calor son las células más avanzadas que el espermatogonio. En observaciones de tejido testicular de animales de este grupo se encontró que la mayoría de las células de los tubos no pasaron la tercera división del espermatogonio (28.3%). Otros tubos no presentaron ninguna actividad mitótica y los espermatogonios están en el mismo estado (29.1%). Además, en ciertos sectores de la pared del tubo, hubo divisiones que llegaron a espermatozoides (6.2%) y otros sectores se presentan sin actividad mitótica. La concentración de espermatogonios y espermátidas fue distinta en sectores dentro del tubo y entre tubos. Las células de Sertoli se presentaron

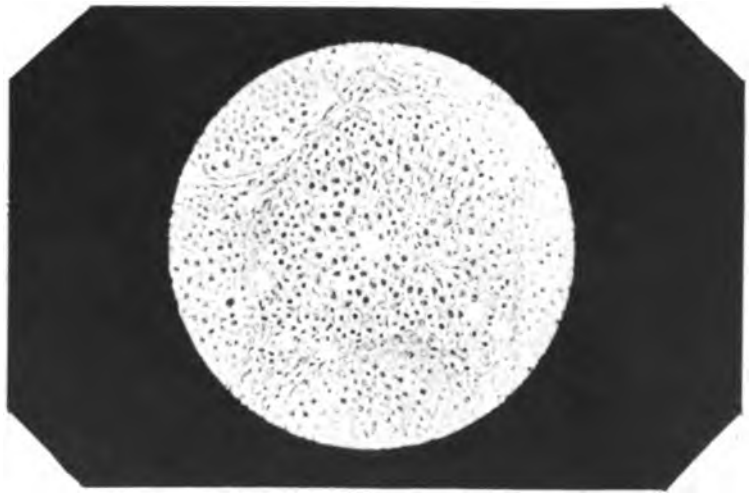
Estado a.



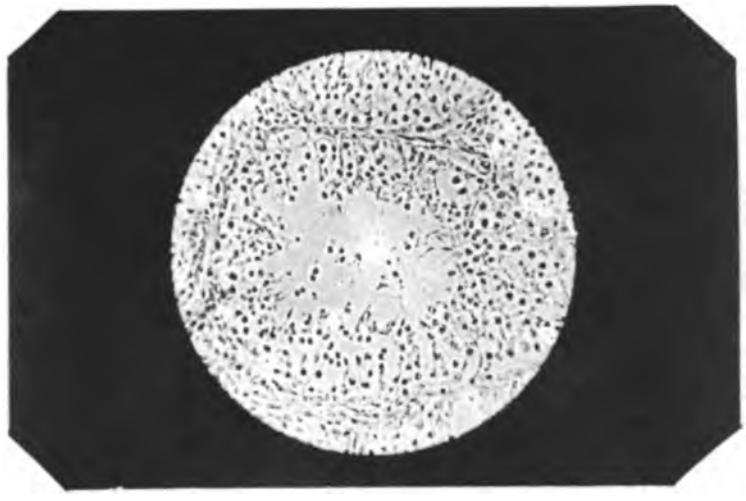
Estado b.



Estados c y d.



Estado e.



Estado f.

incoloras y retraídas. En algunos tubos estas células no se presentaron. En los intersticios no tubulares se observó la presencia de vacuolas. Dá la impresión de que los tubos tienden a separarse del tejido intersticial.

En base a estos resultados se puede afirmar que con temperaturas de 98ºF, no se cumple normalmente la actividad espermatogenésica. Las divisiones celulares en la mayoría de los tubos termina con la espermatogonia tipo B y esporádicamente en espermátidas.

Cupps y Laben (16), observaron tejido testicular de toros que producían semen de baja concentración, y encontraron que la fase 3, fue la más frecuente. Los animales del grupo cámara climática de este experimento produjeron semen de baja concentración. Observando los tubos con similitud a los estados, se encontró que la fase 3 fue la más frecuente. Además, Cupps y Laben (16), en estos mismos toros determinaron 17.2% de tubos degenerados (células gigantes, citólisis, células multinucleadas). En este experimento se encontró 71.75% de tubos degenerados (no por conformación de células sino por el número de las divisiones). En este porcentaje está incluído 8.0% de tubos degenerados. La apariencia de este tubo consiste en que los espermatocitos, espermátidas y espermatozoides están mezclados. No se observa secuencia de las divisiones.

Las diferencias en frecuencia de estados entre tratamientos fue grande. Se puede afirmar que la alta temperatura tuvo efecto directo sobre el testículo, y deprimió su función espermatogenésica.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el presente estudio se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento con alta temperatura no tuvo efecto en el desarrollo corporal.
2. La temperatura tuvo su influencia deprimente en la espermatogénesis de toretes Jersey.
3. Con tratamiento de altas temperaturas, los animales produjeron el primer semen con espermatozoides móviles a mayor edad que en ambiente natural.
4. Las características de calidad del semen producido fueron superiores en animales de ambiente natural.
5. Las medidas de los segmentos del sistema genital de los animales de ambiente natural superaron a los de cámara climática.
6. El número de espermatozoides en reserva de los testículos y epidídimo en toretes de cámara climática fueron significativamente inferiores a los de ambiente natural.
7. En las observaciones histológicas de testículo de los animales de ambiente natural se encontraron todos los estados de la espermatogenesis. En cámara climática la espermatogénesis fue incompleta con 71.6% de los tubos seminíferos en estado de desorganización sin fases reconocibles.
8. Los animales de cámara climática, después de adaptarse al ambiente cálido-húmedo (37ºC y 90% de humedad relativa), desde la edad del destete hasta la pubertad, demostraron incapacidad en sus funciones reproductivas.

RESUMEN

El experimento se realizó en el Departamento de Industria Animal del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Para este experimento se utilizaron dieciocho toretes Jersey hijos del mismo padre con edad al iniciar el tratamiento con temperatura, de 26 semanas y peso de 79.5 Kg., distribuídos en dos tratamientos:

1. Diez en cámara climática con temperatura regulada a 37ºC y humedad relativa de 90% durante 8 horas diarias.
2. Ocho en una cámara parecida a la anterior con temperatura máxima de 27ºC y mínima de 19ºC. La humedad relativa en esta cámara fue de 80-90%.

Los animales bajo estudio permanecieron en sus respectiva cámaras desde la edad de 26 semanas hasta 20 días después de obtener la quinta eyaculación de cada uno. Fecha en que fueron sacrificados. La exposición a temperatura de los animales en cámara caliente fue de 303 días y en cámara templada 273 días.

Las recolecciones de semen se hicieron con intervalo de nueve días entre saltos, por medio de la vagina artificial.

Durante el experimento se hicieron las siguientes observaciones:

1. Edad y peso en la primera eyaculación con espermatozoides.
2. Volumen eyaculado, en ml.
3. La motilidad en porcentaje de 1 a 100%.
4. El pH con potenciómetro Beckman.
5. La vitalidad de los espermatozoides con pruebas de reducción del azul de metileno y resazurina.
6. En frotis de semen teñidos con eosina y añilina azul, el número de espermatozoides vivos, muertos, normales y anormales.

7. Con hemocitómetro (Thoma-Kammer) la concentración de espermatozoides.
8. Las medidas de los segmentos de sistema genital.
9. El número de espermatozoides en reserva gonadal y epidídimo por medio del método de Amann y Almquist.
10. Estados del ciclo del epitelio germinal utilizando el método desarrollado por Ortavant.

Los análisis de variancia con pesos a la primera eyaculación con espermatozoides móviles, pesos al sacrificio y pesos en canal no fueron estadísticamente significativos. La edad a la primera eyaculación fue mayor en animales de cámara climática ($P < .0\ 5$).

No hubo diferencia en volumen eyaculado y pH entre tratamientos. La concentración de espermatozoides en el semen de animales de cámara climática fue de 9.21×10^4 y 92.78×10^4 en animales de ambiente natural. La motilidad inicial en animales de cámara climática fue de 4.08% y 41.57% en animales de ambiente natural. El 85% de los espermatozoides en el semen producido por animales de cámara climática estuvieron muertos y 54.04% anormales. En ambiente natural el 44.37% de espermatozoides estuvieron muertos y 42.4% anormales.

Los pesos de testículo, cabeza y cuerpo del epidídimo fueron mayores en animales de ambiente natural ($P < .0\ 1$) y $P < .0\ 5$% la cola del epidídimo. No hubo diferencia significativa entre tratamientos en el peso del conducto deferente, ampulla y vesícula seminal. El peso de la túnica albugínea corregida por 100 g. de testículo fue mayor en animales de cámara climática ($P < .0\ 1$). El peso testicular expresado como

porcentaje del peso en canal, fue mayor en animales de ambiente natural ($P < .05$).

Las diferencias en número de espermatozoides en reserva gonadal y epidídimo fueron superiores en animales de ambiente natural ($P < .01$).

En las preparaciones histológicas de testículo se observaron todas las fases de la espermatogenesis en animales de ambiente natural. En los de la cámara climática se observaron 28.3% de los tubos con apariencia de fases y 71.7% en estado de desorganización sin fases reconocibles e inactividad mitótica.

SUMMARY

The experiment was carried out in the Animal Industry Department of the Inter-American Institute of Agricultural Sciences.

Eighteen young Jersey bulls all from one sire were used. Average age and body weight at the beginning of the experiment were 26 weeks and 79.5 Kg. respectively. They were distributed in two treatments as follows:

1. Ten in the climatic chamber, with a controlled temperature of 37ºC and 90% relative humidity for 8 hours daily.
2. Eight in a chamber similar to the climatic chamber, with a maximum temperature of 27ºC and minimum of 19ºC. The relative humidity was 80-90%.

These animals were maintained under their respective treatment conditions until 20 days after the fifth ejaculation, after which they were slaughtered (for post mortem examination). Average exposure time to the treatment conditions was 303 days in the high temperature chamber and 273 days in the normal temperature chamber.

The semen collections were made at nine day intervals, using the artificial vagina.

During the experiment the following observations were made:

1. Age and body weight in the first ejaculation with motile spermatozoa.
2. Ejaculate volume in ml.
3. Motility in percent.
4. pH in beckman potentiometer.
5. Spermatozoa vitaly through methylene blue and resazurin reductase test.

6. In semen smears dyed with eosin and aniline blue, the number of live and dead, normal and abnormal spermatozoa.
7. Concentration of spermatozoa, with a hemocytometer (thoma Kammer).
8. The measurement of the parts of the genital system.
9. Measurement of gonadal and epidydimal sperm reserves by the method used by Amann and Almquist.
10. The stages of the seminiferous epithelial cycle through histological technique described by Ortavant.

The analysis of weights at the first ejaculation with motile spermatozoa, weight at the slaughter and carcass weight showed no significant differences. The age at the first ejaculation was greater in animals from the climatic chamber ($P < 0.05$).

The difference between treatments in volume and pH of ejaculate showed no statistical significance. The semen concentration of animals from the climatic chamber was 9.21×10^4 and 92.78×10^4 from the temperate chamber. The initial sperm motility of animals from the climatic chamber was 4.08 percent, and 41.57 percent from the temperate chamber. 85 percent of sperms produced by animals from the climatic chamber were dead and 54.04 percent were abnormal. Corresponding figures for the temperate chamber were 44.37 percent dead sperm and 42.4 percent abnormal.

There were significant differences between treatments ($P < 0.01$) in the testes, caput and corpus epididymis weight, and ($P < 0.05$) in the cauda epididymis. The differences between treatments in the vas deferens, ampullae and seminal vesicle were not significant. The tunica albuginea weight, corrected for 100 g. of testis was greater in

animals from the climatic chamber ($P < 0.01$). The testicular weight expressed as a percentage of carcass weight was greater in animals from the temperate chamber ($P < 0.05$).

The gonadal and epididymal sperm reserves were higher in animals from the temperate chamber ($P < 0.01$).

The testes of the animals under normal environment exhibited all the phases of spermatogenesis. Under high temperature conditions spermatogenesis was incomplete, 71.7 percent of the seminiferous tubules being in a disorganized state, with neither recognizable phases nor mitotic activity. The remaining 28.3 percent of tubules exhibited recognizable phases.

LITERATURA CITADA

1. ALMQUIST, J. O. & AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. II. Gonadal and extra-gonadal sperm reserves as determined by direct counts and depletion trials; dimensions and weight of genitalia. Journal of Dairy Science 44(9): 1668-1679. 1961.

2. _____ & O'DELL, W. T. Sperm reserves of dairy bulls as determined by depletion trials and postslaughter sperm counts (abstract). Journal of Dairy Science 41(5):733. 1958.

3. AMANN, R. P. & ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. Journal of Dairy Science 44(8): 1537-1543. 1961.

4. _____ Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. Journal of Dairy Science 45(6):774-781. 1962.

5. AUSTIN, J. W., HUPP, E. W. & MURPHEE, R. L. Effect of scrotal insulation on semen of Hereford bulls. Journal of Animal Science 20(2):307-310. 1961.

6. BAKER, F. N., VANDEMARK, N. L. & SALISBURY, G. W. Growth of Holstein bulls and its relation to sperm production. Journal of Animal Science 14(3):746-752. 1955.

7. BANGHAM, A. D. & HANCOCK, J. L. A new method for counting live and dead bull spermatozoa. Nature 176(4483):656. 1955.

8. BIALY, G. & SMITH, V. R. Influence of seminal vesicular fluid on morphology of bull spermatozoa. Journal of Dairy Science 41(3):422-428. 1958.

9. _____ Number of spermatozoa in the different parts of the reproductive tract of the bull. Journal of Dairy Science 41(12):1781-1786. 1958.

10. BISHOP, D. W. & MATHEWS, H. P. The significance of intravas pH in relation to sperm motility. Science 115(2982):209-211. 1952.

11. _____ & WALTON, A. Spermatogenesis and the structure of mammalian spermatozoa. En Marshall's Physiology of Reproduction. 3 ed. London, Longmans. 1960. V. 1. pp. 1-127.

12. BRANTON, C., BRATTON, R. W. & SALISBURY, G. W. Total digestible nutrients and protein levels for dairy bulls used in artificial breeding. Journal of Dairy Science 30(12): 1003-1013. 1947.

13. BRANTON, C. & SALISBURY, G. W. Morphology of spermatozoa from different parts of the reproductive tract of the bull. Journal of Animal Science 6(2):154-160. 1947.

14. BRATTON, R. W. ET. AL. Influence of underfeeding and overfeeding from birth thougth 80 weeks of age on growth, sexual development, semen production and fertility of Holstein bulls. New York (Cornell). Agricultural Experimental Station. Bulletin 964. 1961. 24 p.

15. CASADY, R. B., MYERS, R. M. & LEGATES, J. E. The effect of exposure to high ambient temperature in spermatogenesis in the dairy bull. Journal of Dairy Science 36(1):14-23. 1953.

16. CUPPS, P. T. & LABEN, R. C. Spermatogenesis in relation to spermatozoa concentration in bovine semen. Journal of Dairy Science 43(6):782-786. 1960.

17. _____ & MEAD, S. W. Histology of the pituitary, testes and adrenal in relation to reproduction in the bull. Journal of Dairy Science 37(9):1074-1087. 1954.

18. DENNIS, T. ET. AL. The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. Journal of Animal Science 10(1):226-235. 1951.

19. DOUNCE, A. L. Isolation and properties of chicken erythrecyte nuclei. Science 97(2530):584-585. 1943.

20. DUTT, R. H. Temperature and light as factors in reproduction among farm animals. Journal of Dairy Science 43(supl): 123-139. 1960.

21. _____ & HAMM, P. T. Effect on exposure to high environmental temperature and shearing on semen production of ram in winter. Journal of Animal Science 16(2):328-334. 1957.

22. EMMENS, R. J. Fertility in the male. En Progress in the physiology of farm animals, edited by John Hammond. London, Butterworths Scientific Publications, 1959. Supplement. pp. 1047-1116.

23. FLIPSE, R. J. Effect of corn silage on the growth, reproduction development and semen production of young dairy bulls. Journal of Animal Science 16(1):158-164. 1957.

24. _____ ET. AL. Effect of total digestible nutrient intake on growth and reproductive development of dairy bulls. Pennsylvania Agricultural Experiment Station. Progress Report 104. 1953. 14 p.

25. FOSSLAND, R. G. & SCHULTZE, A. B. A histological study of the postnatal of the bovine testis. Nebraska Agricultural Experiment Station. Research Bulletin 199. 1961.

26. GATEMBY, J. B. & BEAMS, H. W. The microtomist's vade-mecum. 11 ed. Philadelphia, The Blakiston Company. 1950. 753 p.

27. GLOVER, T. D. The effect of a short period of scrotal insulation on the semen of the ram. Journal of Physiology 128:22 p. 1955. (Original no disponible para consulta; compendiado en Animal Breeding Abstracts 23(4):396. 1955).

28. _____ Desintegrated spermatozoa from the epididymis. Nature 190)4771):185-186. 1961.

29. HAFEZ, E. S., BADRELDIN, A. L. & DARWISH, Y. N. Seasonal variations in semen characteristics of sheep in the subtropics. Journal of Agricultural Science 45(3):283-292. 1955.

30. HALE, E. B. & ALMQUIST, J. O. Relation of sexual behavior to germ cell output in farm animals. Journal of Dairy Science 43(supl.):145-169. 1960.

31. HERMAN, H. A. & MADDEN, F. W. The artificial insemination of dairy bulls; a handbook and laboratory manual. Columbia, Missouri, Lucas Brothers, 1953. 110 p.

32. HOMMA, K. Effect of age on the metabolism of testes. Japanese Journal of Zootechnical Science 24:49-51. (Original no disponible para consulta; compendiado en Animal Breeding Abstracts 22(2):146. 1954).

33. HUPP, E. W. ET. AL. Sperm production of Hereford bulls at different intensities of collection. Journal of Animal Science 21(2):272-276. 1962.

34. JOHNSTON, J. E. & BRANTON, C. Effect of seasonal climatic changes on certain physiological reactions, semen production and fertility of dairy bulls. Journal of Dairy Science 26(9): 934-942. 1953.

35. JONES, I. R., DOUGHERTY, R. W. & HAAG, J. R. Relation of nutrition to growth and breeding performance in dairy bulls. Journal of Dairy Science 28(4):311-320. 1945.

36. LASLEY, J. L. Spermatozoan motility as a measure of semen quality. Journal of Animal Science 10(1):211-218. 1951.

37. MERCIER, E. & SALISBURY, G. W. The effects of season on the spermatogenic activity and fertility of dairy bulls used in artificial insemination. The Cornell Veterinarian 36:301-310. 1946.

38. MOORE, C. R. Testicular reactions in experimental cryptorchidism. American Journal of Anatomy 34:269. 1922.

39. NALVANDOV, A. V. Reproductive Physiology. London, W. H. Freeman & Company, 1958. 271 p.

40. ORTAVANT, R. Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon. En Cole, H. H. & Cupps, P. T. Reproduction in domestic animals. New York, Academy Press, 1959. v. 2, pp. 1-50.

41. _____ A study of the duration of spermatogenesis in the ram using P^{32}. Compte Rendu des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales (Paris) 148:804-806. 1954. (Original no disponibles para consulta; compendiado en Animal Breeding Abstracts 23(3):290. 1955).

42. _____ The speed o spermatozoal movement in the ram epididymis determined by P^{32}. Compte Rendu des Séances de la Sociéte de Biologie et de ses Filiales (Paris) 148:866-868. 1954. (Original no disponible para consulta; compendiado en Animal Breeding Abstracts 23(3):290. 1955).

43. PHILLIPS, R. W. & ANDREWS, F. N. The development of the testes and scrotum of the ram, bull and boar. Massachusetts Agricultural Experiment Station. Bulletin 331. 1936. 16 p.

44. _____ & McKENZIE, F. F. The thermo-regulatory function and mechanism of scrotum. Missouri Agricultural Experiment Station. Research Bulletin 217. 1934.

45. REID, J. T., WORD, G. M. & SALSBURY, R. L. Simple versus complex concentrate mixtures for young breeding bulls. II. Semen production. Journal of Dairy Science 31(6):439-477. 1948.

46. SALISBURY, G. W. & VANDEMARK, N. L. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. London, W. H. Freeman & Company, 1961. 639 p.

47. SCHMIDT, K. The methylene blue reduction test for determining the fertility of bull sperm. Monatshoft für Veterinar Medizin (Alemania) 10:228-229. (Original no disponible para consulta; compendiado en Animal Breeding Abstracts 24(3):258. 1956).

48. SFERCO, A. La correlazione tra cinética dei nemaspermi o colorazione posvitale con il bleu bromo fenol nigrosina (método Bonadonna-Olgiati). Zootecnica e Veterinaria 11(7-8): 333-338. 1956.

49. SHAFFER, H. E. & ALMQUIST, J. O. Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture. Journal of Dairy Science 31(8):677. 1948.

50. SHUKLA, D. D. & BHATTACHARYA, P. Seasonal variation in reaction time and semen quality of goats. Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry 22(3):179-197. 1952.

51. TURNER, C. D. General endocrinology. 3 ed. Philadelphia, W. D. Saunders Company, 1961. 511 p.

52. VANDEMARK, N. L., MERCIER, E. & SALISBURY, G. W. The methylene-blue reduction test and its relation to other measures of quality in bull semen. Journal of Dairy Science 28(2): 121-128. 1945.

53. VOHNOUT, K. Efectos de la fibra cruda en la nutrición de los bovinos en ambientes cálido-húmedos. Tesis sin publicar. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 1962.

54. WALTON, A. Spermatogenesis and nutrition. The British Journal of Nutrition 3(1):83-86. 1949.

55. _____ The initiation of motility in mammalian spermatozoa. Proceedings of the Society for the Study of Fertility (Cambridge) 8:53-57. 1957.

56. _____ & EDWARDS, J. Criteria of fertility in the bull. I. The exaustion test. The American Society of Animal Production (Record of Proceedings) 31:254-259. 1938.

57. WILSON, R. L., FOWLER, S. H. & HANSARD, S. L. Evaluation of rapid methods for stimating concentration of ram spermatozoa (abstract). Journal of Animal Science 20(1):393. 1961.

58. WILLET, E. L. & OHMS, J. I. Measurement of testicular size and its relation to production of spermatozoa by bulls. Journal of Dairy Science 40(12):1559-1569.

59. YOUNG, W. C. The influence of high temperatures on the guinea pig testis. Journal Experimental of Zoology 49:459-499. 1927.

Date Due

~~6 ENE 1984~~
19 ENE 1984
REV SEP 1991
2 JAN 1993
REV UBL 1993
11 OCT 1994