

Efecto del pH del diluyente sobre la motilidad y fertilidad del semen de carnero

Lafuf, O.*; Chiossoni, M.*; Cresci, A.* y Rodríguez-Martínez, H.**

SUMMARY

In ruminants, the intracellular pH is involved in regulating the enzymatic activity and the complex processes involved in regulating sperm motility. We have studied the effect of the dilution in citrate-egg yolk with acidic (6.3) or neutral (7.2) pH upon the *in vitro* motility and acrosome viability and the *in vivo* fertility of ram semen, aiming at increasing their survival rate without detriment of their fertilizing ability. The acidic extracellular pH caused a change in the pattern of sperm movement with a decreased flagellar beating rate, without obvious decrease of the percentage of individually progressive motile spermatozoa, following dilution and refrigeration for up to 24 hours. There were neither any deleterious effects upon the integrity of plasma membranes nor acrosomes. The fertility of ram semen, diluted and maintained up to 16 hours at 4° C in pH 6.3 was significantly higher (60%) than its counterpart in pH 7.2 (30%). The use of acidic diluents contributes to the preservation of ram semen in field conditions.

Key Words: SEMEN, SEMEN PRESERVATION, SHEEP, pH

RESUMEN

En rumiantes el pH intracelular está involucrado en el control de la actividad enzimática y por ende, de procesos complejos como la motilidad del espermatozoide. El efecto de la dilución en citrato-yema a pH ácido (6,3) y neutro (7,2) sobre la viabilidad *in vitro* y la fertilidad *in vivo* del semen de carnero, con el fin de incrementar su sobrevivencia sin detrimento de su capacidad fecundante, fue estudiado. El pH ácido extracelular provocó un entrecimiento del batido flagelar, sin disminución aparente del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, luego de la dilución y refrigeración (4° C) por hasta 24 horas. Tampoco hubo un efecto deletéreo sobre la integridad de membranas o acrosomas, confirmado ultraestructuralmente. La fertilidad del semen ovino diluido y mantenido refrigerado hasta 16 horas en pH 6,3 fue más alta (60%) que su contrapartida en pH 7,2 (30%). El uso de diluyentes ácidos contribuye a la preservación del semen de carnero en condiciones de campo.

Palabras Claves: CONSERVACION DE SEMEN, OVINOS, PH, SEMEN

INTRODUCCION

Los cambios en el pH intraespermático que se producen en el momento de la eyaculación se han considerado envueltos en la regulación del inicio de la motilidad del semen bovino (Acott y Carr, 1984) y suino (Rodríguez Martínez y col., 1990; Rodríguez Martínez, 1990). El semen de estas especies es almacenado en la cola del epidídimo previo a la eyaculación y cuando se lo examina en fluido caudal no diluido, exhibe mínima motilidad progresiva. El pH del fluido de la cola epididimaria en bovinos es de 5,8 (Carr y Acott, 1984), en suinos de 6,3 (Rodríguez Martínez y col., 1990) y en ovinos 6,0-6,4 (Rodríguez-Martínez, sin publicar).

Si el pH del fluido epididimario es elevado a aproximadamente 7,0 (sin que medie dilución) o, si el fluido es diluido en el orden 1:10 (sin que medie cambio de pH), los espermatozoides comienzan a moverse vigorosamente (Acott y Carr, 1984; Carr y Acott, 1984). Lo mismo parece ocurrir en el caso del cerdo (Rodríguez Martínez, datos sin publicar). Ambos fenómenos (dilución y elevación del pH) ocurren concomitantemente durante la eyaculación y cualquiera de ellos es suficiente para producir un inicio irreversible de la motilidad.

En el caso de pequeños rumiantes, la situación es si-

mililar, existe un microambiente ácido en la cola del epidídimo, con espermatozoides inmóviles y en el momento de la eyaculación, la motilidad aumenta en forma intensa al producir en primer lugar una dilución de los espermatozoides en la secreción de las glándulas anexas (vesículas seminales) las cuales descargan un fluido rico en bicarbonato, lo que trae aparejado el doble efecto indicado anteriormente (Rodríguez Martínez, 1990).

La dilución ulterior del semen ovino, en condiciones prácticas de manejo para inseminación artificial, trae aparejado una disminución gradual de la motilidad progresiva y de la propia viabilidad del semen (Castrillejo y Rodríguez, 1982). Este sufrimiento del semen de carnero a la dilución estaría, en cierta medida, vinculado al pH de los diluyentes usados comúnmente (7,2-7,4) lo que, sumado a la eliminación por dilución, del rol protector (decapacitante) del plasma seminal induciría un aumento de la motilidad y de la reacción acrosómica (Zlatav y col., 1988b). Una vez producida esta falsa reacción acrosómica, los espermatozoides -no obstante su alta motilidad *in vitro*- son infértiles.

Sin embargo, la dilución de semen ovino en diluyentes con pH ácido (6,0-6,3) trae aparejada la disminución *in vitro* de la liberación de enzimas acrosomales, indicando que el pH ácido es el que mejor preserva la estabilidad de la enzima acrosina, la que juega un rol clave en el proceso de fe-

* COOPERATIVA AGROPECUARIA de Young, Departamento Veterinario, Río Negro, Uruguay.

** UNIVERSIDAD SUECA de Ciencias Agrícolas, Facultad de Medicina Veterinaria, Uppsala, Suecia.

cundación (Zlatarev y col., 1988a). El efecto que una dilución en pH ácido, del orden del encontrado en la coia epididimaria (aprox. 6,3) tenga sobre la motilidad y viabilidad espermática en carneros no ha sido, a nuestro entender, aún explorado.

Por consiguiente, se reportan aquí estudios realizados para determinar la influencia del pH del diluyente sobre la motilidad in vitro, la morfología del acrosoma (a nivel de microscopía óptica y electrónica) y la capacidad fecundante in vivo del semen ovino.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se usaron 4 carneros (3 Landrace suecos, localizados en Uppsala, y 1 carnero Corriedale, Dpto. de Río Negro, Uruguay) de 2-3 años de edad. Los animales tenían una historia clínica reproductiva normal, con alta fertilidad, sin patologías previas. Al examen clínico no se detectaron patologías, la serología (*Brucella ovis*) fue negativa y su íbido fue normal.

Colección de semen y evaluación

El semen (n= 4-6 eyaculados de cada carnero) se colectó con vagina artificial. Se determinó volumen y la concentración por ml se colectaron muestras para espermograma de rutina. El pH del semen fue determinado inmediatamente a la colección con un pH-metro (Radiometer, Copenhague) y la motilidad progresiva espermática por medio de la observación directa a 37°C en un microscopio equipado con óptica de contraste de fase e interferencia (Nomarski, 200-250x).

Luego de la evaluación preliminar de los reproductores machos, el trabajo se realizó en dos experimentos a saber:

Experimento 1 (estudios in vitro)

Cada eyaculado de los 3 carneros Landrace (n= 6 eyaculados por carnero) se dividió en dos alícuotas, una de las cuales se diluyó (1:1) en citrato-yema (3 g citrato de sodio, 20 ml de yema de huevo, agua destilada csp 100 ml, estrep-tomicina 0,5 g penicilina 1: UI) a pH 7,2 y la otra en el mismo diluyente pero titulado a pH 6,3 con solución acuosa de ácido cítrico al 10%, ambos a 30° C. La temperatura se disminuyó paulatinamente y el semen se mantuvo hasta 24 horas a 4° C. El semen en ambos diluyentes se examinó (pH, motilidad progresiva a 37° C) y se tomaron muestras para evaluación de integridad de acrosoma a las 6, 12, 18 y 24 horas de la dilución.

La evaluación de integridad acrosómica fue realizada por medio de examen mediato con contraste de fase en muestras fijadas con formol bufferado y también usando tinción de eosina-nigrosina, combinada, con contraste de fase (Bamba, 1988).

Muestras representativas de espermatozoides pre-post-dilución fueron fijadas, por inmersión, en una solución al 3% de glutaraldehído en tampón cacodilato de sodio 0,067 M (pH 7,2; 500 mOsm) durante 8 horas o más. Luego, las muestras se lavaron en tampón cacodilato a 4° C y se post-fijaron en solución acuosa de tetróxido de osmio al

2%. Las suspensiones de espermatozoides se deshidrataron mediante pasaje por concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno y fueron incluidas en resina plástica (Agar 100R, Cambridge, Inglaterra). Cortes semifinos (1 µm) para microscopía óptica se obtuvieron en un ultramicrotomo (UltrotomR, LKB, Suecia) y se colorearon con azul de toluidina tamponada para selección de áreas de interés ulterior. Cortes ultrafinos (60 nm) para microscopía electrónica de transmisión se obtuvieron, se montaron en grillas de cobre y luego de contracoloradas con acetato de uranilo y citrato de plomo, se examinaron en un microscopio electrónico Phillips EM 201 a 60-80 kV.

Experimento 2 (estudios in vivo)

El semen del cuarto carnero (Corriedale, Uruguay) fue usado en un programa rutinario de inseminación artificial en el establecimiento "Valle del Sol", 5a. Sección del Departamento de Río Negro, Uruguay. El semen del carnero mencionado se colectó por medio de vagina artificial en horas de la tarde (aprox. 18:00), se dividió, para ser diluido en citrato-yema (1:1) a pH 6,3 o 7,2. Se mantuvo a 4° C entre 14 y 16 horas hasta la inseminación (0,02-0,05 ml/dosis única) al día siguiente. Por la mañana, se colectó un nuevo eyaculado el cual fue usado fresco (sin diluir y sin refrigerar, 0,01 ml/dosis única), o diluido en pH 6,3 (sin refrigerar, 0,02 ml/dosis única).

Un total de 404 borregas/ovejas (18 meses a 6 años), con peso promedio de 45 kg, fueron inseminadas con una de las 4 variantes de semen expuestos anteriormente, una vez/celo.

casa del
criador RT

**TIJERA
DESVASADORA**

TECNOLOGIA ALEMANA

- MAS LIVIANA
- MAS FUERTE

ACERO DE UNA PIEZA. SE COMPRA UNA SOLA VEZ. NO SE AFILA NUNCA.

RENETAS PARA CASCOS

- DE ACERO • MANGO DE MADERA • 5 MODELOS

DISTRIBUIDOR DE LOS AFAMADOS PRODUCTOS "WALMUR"
GRAL. FLORES 3269 CASI L.A. DE HERRERA
TELS. 23.60.13 / 20.80.40



El celo fue detectado usando carneros vasectomizados. Cada mañana, la mitad de las ovejas se inseminaban con el semen diluido/refrigerado y la otra mitad con el semen fresco (diluido y sin diluir).

De todos los eyaculados colectados se sacaron muestras para evaluar motilidad inmediata, luego de diluir/refrigerar y previo a la inseminación. Asimismo se fijaron estas muestras (1 gota/2 ml de glutaraldehído al 3%), las cuales fueron examinadas en Uppsala para evaluar integridad de membranas plasmáticas y de acrosomas.

Los resultados obtenidos fueron procesados estadísticamente por Chi-cuadrado y Student t-test (Steel y Torrie, 1960).

RESULTADOS

Los carneros no mostraron patologías clínicamente detectables durante el desarrollo del ensayo, el cual fue realizado (aunque en hemisferios diferentes) en épocas del año donde la cantidad de horas luz/día y temperatura fueran similares. Los parámetros seminales de los carneros usados se resumen en la Tabla 1, y demuestran que el semen usado era de buena calidad, con alta concentración y motilidad inicial.

Tabla 1: Características del semen usado en el presente estudio (n=4; 4 eyaculados/carnero; x ± DS).

vol. (ml)	pH	concentr. (mill/mm ³)	motilidad (%)	patologías total	(%) acrosomas
1,2±0,46	7,0±0,17	3,57±0,47	78,2±3,85	4,8±1,31	4,1±1,59

La motilidad progresiva del semen de los carneros incluidos en el experimento 1, de preservación *in vitro*, en citrato-yema a pH 7,2 y 6,3 son presentados en la Tabla 2, mientras que el promedio de daños a las membranas y acrosomas ocasionados en los mismos -detectados en el microscopio óptico- aparecen en la Tabla 3.

Tabla 2: Cambios en la motilidad progresiva (%) de los espermatozoides en semen de carnero incluidos en el experimento 1 diluido en citrato-yema a diferente pH y refrigerado (4° C) hasta 24 horas (n=3,6 eyac./carnero, x ± DS).

pH	dilución (30° C)	diluido y mantenido a 4° C			
		6h	12h	18h	24h
6,3	70,6±7,07	55,0±9,57	53,2±7,22	50,0±8,16	44,2±21,29
7,2	70,0±6,32	65,0±5,00	62,8±4,76	58,3±8,92	46,7±7,45

Tabla 3: Cambios en los porcentajes de daño acrosómico en los espermatozoides del semen de carnero incluido en el experimento 1, diluido en citrato-yema a diferente pH y refrigerado (4° C) hasta 24 horas (n=3, 6 eyac./carnero, x ± DS).

pH	dilución (30° C)	diluido y mantenido a 4° C			
		6h	12h	18h	24h
6,3	5,0±0,79	5,1±1,59	5,0±1,29	4,9±1,74	5,2±0,62
7,2	5,4±1,01	6,4±2,28	6,8±2,00	6,9±1,53	7,6±1,97

La motilidad progresiva disminuyó luego de la dilución, independientemente del pH usado y disminuyó aún más - en forma paulatina- durante la conservación a 4° C, llegando a las 24 horas con un promedio de 44-47 % de espermatozoides con motilidad progresiva (rango 22-66%, P<0,05). Hubo una tendencia a observar un porcentaje de motilidad progresiva individual inferior en los espermatozoides diluidos en pH 6,3 aunque esta diferencia no resultó ser significativa.

La motilidad individual presentó, no obstante, diferencias de pH, cuando se analizó el patrón de motilidad en muestras diluidas y mediante microscopía de contraste de fase/interferencia. Los espermatozoides -que se movían en forma progresiva- a pH 6,3, mostraron una velocidad de batido flagelar más lenta y un patrón de batido parecido al que se encuentra en líquidos de alta viscosidad, cosa que consistentemente no fue vista a pH 7,2.

No se registraron cambios deletéreos en la integridad de los acrosomas examinados, los que se mantuvieron en un promedio de daño acrosómico del 7% (rango 4,6-9,8) durante todo el experimento I, siendo menores (5,6%, rango 4,1-6,4) a pH 6,3 (n.s.).

La microscopía electrónica confirmó estos hallazgos, tal como se observa en los espermatozoides representativos de cada momento y pH usado (Figuras 1-5). La mayoría de los cambios morfológicos registrados fueron dilatación y desprendimiento de la membrana plasmática en el sector anterior de la cabeza del espermatozoide (supra-acrosomal) y cambios en el acrosoma, con dilatación, eliminación del margen apical y en algunos casos la disolución del contenido con ruptura de la membrana acrosómica externa.

Los porcentajes de motilidad progresiva del semen del carnero usado en el experimento II, diluido y mantenido refrigerado por 16 horas, no bajaron en ningún momento del 50%. Los porcentajes de acrosomas dañados fueron similares a los observados en el experimento I (rango 5-10%).

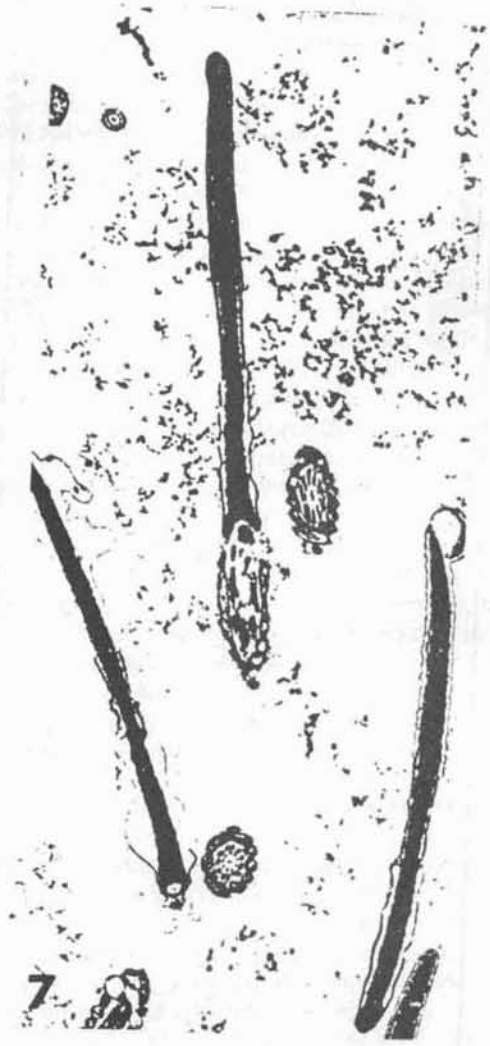
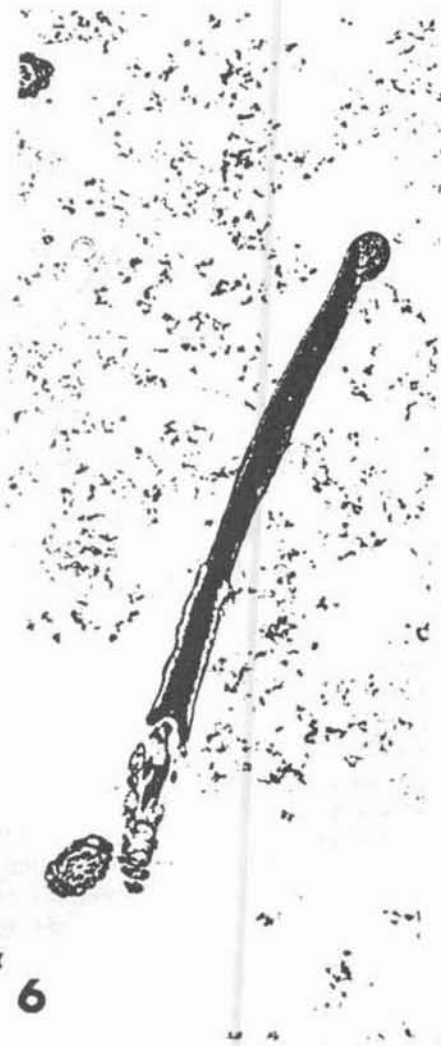
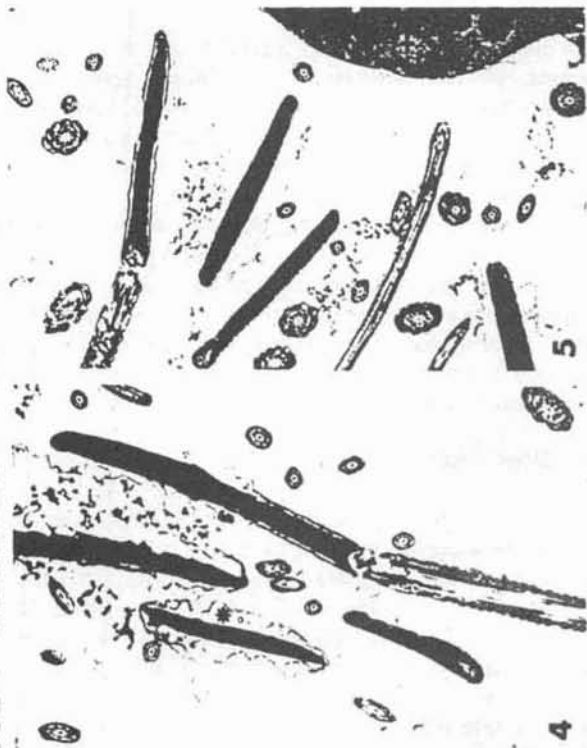
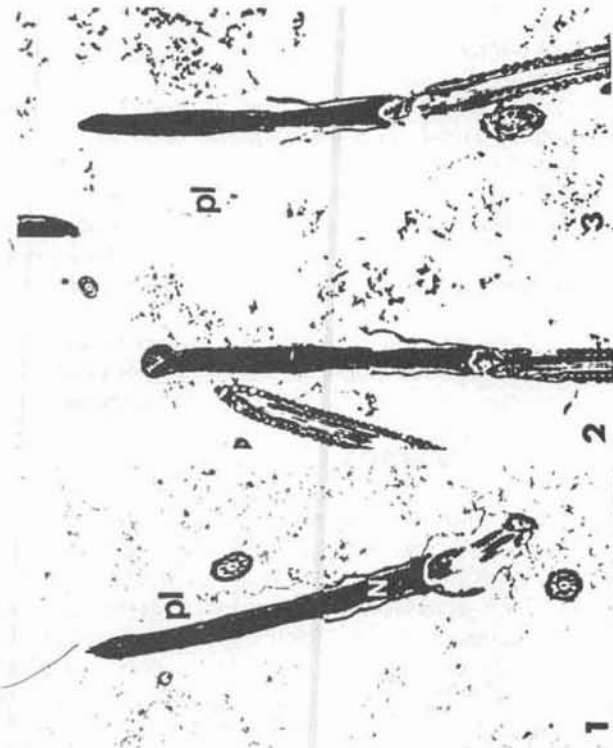
La microscopía electrónica del semen de este carnero, confirmó los hallazgos de la microscopía óptica realizada. Los cambios encontrados fueron fundamentalmente a nivel de la cabeza de los espermatozoides (Figuras 6 y 7), con membranas deterioradas y acrosomas con rarefacción de la cresta acrosómica apical, independientemente del pH usado en la dilución. Hubo sin embargo una tendencia a observar más modificaciones a pH 7,2.

Las tasas de fertilidad (% de no retorno al celo) obtenidas luego de la inseminación artificial realizada, se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Tasas de fertilidad (porcentajes de no retorno al celo) en borregas y ovejas inseminadas artificialmente con semen sin diluir o diluido en citrato-yema con dos pH diferentes e inseminado fresco o conservado por 14-16 horas, a 4° C (n=404).

semen usado	dosis inseminada (ml)	porcentaje de no retorno
fresco		
sin diluir	0,01	81,5
diluido (pH 6,3)	0,02 - 0,05	75,8
Preservado 4° C		
pH 6,3	0,02 - 0,05	58,0
pH 7,2	0,02 - 0,05	31,0*

*difiere significativamente (P<0,05)



La dilución en citrato-yema, a pH 6,3 y su inseminación inmediata, sin refrigeración, no disminuyó significativamente la fertilidad del semen del carnero usado, a pesar de que la motilidad progresiva disminuyó significativamente luego de diluir el semen fresco (tal como se desprende de los resultados del experimento I, *in vitro*).

La dilución y ulterior refrigeración del semen diluido a pH 6,3 y 7,2 por hasta 14-16 horas, mostró resultados de retención a la inseminación artificial que fueron notoriamente inferiores a los obtenidos con el uso de semen sin refrigerar. Sin embargo, el uso de semen diluido en pH 6,3 y refrigerado alcanzó un 58% de retención, contra sólo un 30% cuando se lo diluyó en pH 7,2 ($P < 0,05$).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El pH del fluido epididimario disminuye progresivamente desde la cabeza a la cola del ducto, donde adquiere niveles ácidos (Rodríguez-Martínez y col., 1990). La quiescencia del espermatozoide antes de la eyaculación es debida a su pH intracitoplásmico ácido, el cual a su vez es modulado por el bajo pH (aproximadamente 6,0) del fluido caudal y probablemente (al menos en bovinos) por el alto tenor de lactato producido por el espermatozoide (Carr y Acott, 1989). En cerdos, el ión bicarbonato, cuyos niveles son inferiores a los 3 mM/lt en la cola del epidídimo (Rodríguez-Martínez y col., 1990), ha sido propuesto como el responsable directo del inicio de la motilidad de las células debido a su acción sobre la enzima adenilciclasa espermática (Okamura y col., 1987), mientras que en bovinos hasta 4 proteínas -que muestran cambios fosforilativos con modulación del pH intracelular- aparecen envueltos en el control del movimiento (Carr y Acott, 1989).

La dilución del semen de carnero en medios ácidos, como en el presente trabajo, causó un notorio enlentecimiento del batido flagelar (van Duijn y Rikmenspoel, 1960). Este efecto se presentó también en cerdos (De Bragança y col., 1989; Bwanga y col., 1990) y bovinos (Acott y Carr, 1984; Rodríguez y col., 1989), indicando que la motilidad espermática puede ser modulada mediante la manipulación del pH extracelular (Blackshaw y Emmens, 1951). En principio, el interés de este trabajo era determinar la eventual detención o enlentecimiento casi completo de la motilidad espermática, volviendo a los niveles de inmovilidad existentes en la cola del epidídimo. Este objetivo no fue logrado, si bien los porcentajes de motilidad disminuyeron con el pH 6,3 del diluyente, no se puede concluir que el pH es el causante directo de este enlentecimiento. Es probable que la disminución de la temperatura y el pH, consigan enlentecer el metabolismo espermático, bajar los niveles de producción de ATP (Soderquist y Larsson, 1985) y con ello, disminuir el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.

Si bien estos efectos sobre el metabolismo -disminución de ATP (Rodríguez y col., 1989); baja del movimiento espermático (de Bragança y col., 1989; Bwanga y col., 1990) y la disminución de la actividad enzimática (Okamura y col., 1987; Zlatarev y col., 1988a, 1988b; Acott y Carr, 1989)- pudieran ser considerados adversos para la actividad espermática; también se los puede considerar adecuados para enlentecer el metabolismo espermático y mediante ello, proteger los espermatozoides durante los pro-

cedimientos de dilución y preservación, ya sea enriado o congelado, a los que se les somete comercialmente.

De los resultados obtenidos, no puede decirse que someter al semen de carnero a un pH extracelular ácido es perjudicial, puesto que los efectos sobre la motilidad, integridad acrosómica y hasta sobre su fertilidad fueron reducidos. Por otra parte, ha sido claramente demostrado que este nivel de acidez evita la activación de enzimas acrosómicas y su posterior liberación (Zlatarev y col., 1988a; 1988b).

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que el uso de diluyentes ácidos contribuye a la preservación del semen de carnero en condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los propietarios del establecimiento "Valle del Sol", Depto. de Río Negro, Uruguay por poner sus animales e instalaciones a nuestra disposición. Asimismo agradecen al Sr. Alfredo Etcharne por su excelente trabajo de inseminación, a la Sra. Asa Jansson por su excelente asistencia técnica en microscopía electrónica y al Dr. Jorge Rodríguez por su invaluable ayuda durante su pasantía en Uppsala, Suecia. Este trabajo recibió financiación parcial del Consejo Sueco de Investigaciones Forestales y Agrícolas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acott, T.S.; Katz, D.F. / Hoskins, D.D. 1983 Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa; Effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 29: 389-399.
- Acott, T.S. & Carr, D.W. 1984 Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30:926-935.
- Bamba, K. 1988 Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using and eosin-nigrosin stain., *Theriogenology* 29: 1245-1251.
- Blackshaw, A.W.; Emmens, C.W. 1951 The interaction of pH, osmic pressure and electrolyte concentration on the motility of ram, bull and human spermatozoa. *J. Physiol.* 114:116-26.
- Bragança, M.M.de; Bwanga, C.O.; Einarsson, S. & Rodríguez-Martínez, H. 1989 Viability of boar semen exposed to an acidic extender and preserved at 20° for up to 48 hours. *Proc. SIPAR 19th Postgr. Course Uppsala.*
- Bwanga, C.C.; de Bragança, M.M.; Einarsson, S. & Rodríguez-Martínez, H. 1990 Cryopreservation of boar semen in mino- and maxi-straws. *J. Vet. Med.* (Accepted for publication).
- Carr, D.W. & Acott, T.S. 1984 Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid.I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol. Reprod.* 30:913-925.
- Carr, D.W.; Usselman, M.C. & Acott, T.S. 1985 Effects of pH lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol. Reprod.* 33: 588-595
- Carr, D.W. & Acott, T.S. 1989 Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol. Reprod.* 41: 907-920.
- Castrillejo, A. & Rodríguez, H. 1982 Fertilidad seminal en carneros. *Veterinaria (Montevideo)* 18: 19-21 (span, engl

summ.).

Duijn, C. van & Rikmenspoel, R. 1960 The mean velocity and velocity distributions of normal bull spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations, derived from photoelectric measurements. J. Agric. Sci., 54: 300-309

Mann, T. & Lutwak-Mann, C. 1982 Male reproductive function and semen: Themes and trends in physiology, biochemistry and Investigativa andrology. Berlin, Springer-Verlag.

Duijn, C. van & Rikmenspoel, R. 1960. The mean velocity and velocity distributions of normal bull spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations, derived from photoelectric measurements. J. Agric. Sci., 54:300-309.

Okamura, N.; Y & Sugita, Y 1987 Regulation of mammalian sperm activity by bicarbonate in genital fluids. In: Mohri, H., ed. New horizons in sperm cell research. Tokyo, Japan Science Society Press. p. 197-203.

Rodríguez, J.; Soderquist, L & Rodríguez-Martínez, H. 1989 Influence of the pH of the diluent onto the viability of frozen bull spermatozoa. Proc. SIPAR 19 th Postgr. Course, Uppsala.

Rodríguez-Martínez, H. 1990. Aspects of the electrolytic

composition of boar epididymal fluid with reference to sperm maturation and storage. 2nd Int. Conf. Boar Semen Preservation, (Johnson, L.; Colenbrander, P.; Weltze, K. & Larsson, K., eds), USDA, Beltsville, USA. 15 pp.

Rodríguez-Martínez, H.; Ekstedt, E. & Einarsson, S. 1990 Acidification of the epididymal fluid in the boar.

Int. J. Androl., 13: 238-243. Steel, R. & J. Torrie 1960 Principles and procedures of statistic. New York. McGraw-Hill.

Soderquist, L & Larsson, K 1985 Relationship between ATP content and post-thaw motility in bull semen. Acta Vet Scand. 26:308-312.

Zlatarev, S.T.; Goerglev, G.H.; Petrova, K.G. & Mincheva, M.B. 1988. Influence of pH of diluters on some acrosomal enzymes of ram spermatozoa stored at 0-4° C for up to 48 hours. Proc. 11 th ICARAI Congress, Dublin, EIRE, 2: 318 3 pp.

Zlatarev, S.T.; Ljeva, A.T., Mincheva, M.B. & Ivanov, A.G. 1988b Investigations on rate of cooling and temperature of preservation of liquid ram semen. Proc. 11th ICAI Congress, Dublin, EIRE, 2:319 3pp.

Recibido: 19.09.90

Ahora le anunciamos
la formulación ideal en
antibióticos de Larga
Acción

Terramicina ^{*}L.A.
Solución Inyectable



PRIMER Y UNICO ANTIBIOTICO DE AMPLIO ESPECTRO Y LARGA ACCION

* Marca de fábrica de la oxitetraciclina

pfizer

Distribuidor en el Uruguay:

ciencia

AV. LUIS A. DE HERRERA 4011
TELS.: 29 69 11 - 20 86 74 - MONTEVIDEO