

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA, VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Detección de Anticuerpos Séricos Antiespermatozoides en Vacas Repetidoras de la Raza Holstein.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

CARLOS ARTURO ACOSTA QUESADA

GUADALAJARA, JALISCO. 1978

Quienes se han desvelado por
formarme un futuro mejor, --
con profundo agradecimiento
y cariño a mis Padres

SR. NAUTILIO ACOSTA SAENZ.
SRA. ROMELIA QUESADA B. DE ACOSTA.

Con mucho aprecio a mis hermanos:

ERIC.
EDGAR Y MARITZA.
JAVIER Y OFELIA
EVERARDO Y MIRIAM
VICTOR Y MARITZA.
LIDILIA.
VIRGITA.

A mi esposa que con su
cariño y comprensión -
me han ayudado a fina-
lizar esta Carrera.

FLORES ISABEL B. DE ACOSTA.

Con profundo respeto y admiración
a mi Asesor.

DR. JOSE ROBERTO SALGADO RODRIGUEZ.

Por su valiosa colaboración
en este trabajo a
Q.F.B. ROSA ELENA VALDEZ MIRAMONTES.

Con agradecimiento al
DR. PEDRO GARZON DE LA MORA.



OFICINA DE
ASESORIA CIENTIFICA

Al honorable Jurado:

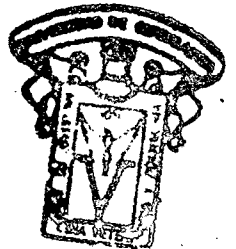
M.V.Z. GUIFRE MURIA I. ROURET.
M.V.Z. HIRAM OSIRIS GONZALEZ CANDELAS.
M.V.Z. JUAN ANTONIO GONZALEZ MENDOZA.
M.V.Z. JUAN MERCADO AGREDAÑO.
Q.F.B. ROSA ELENA VALDEZ MIRAMONTES.

A TODOS MIS MAESTROS.

CON RESPETO Y GRATITUD
A MI FACULTAD.

A TODOS LOS COMPAÑEROS DE LA
X GENERACION.

A TODOS MIS AMIGOS.



OFICINA DE
DIFUSION CULTURAL

- I N T R O D U C C I O N -

Las lesiones traumáticas y las infecciones uterinas son las que dan origen al paso de los espermatozoides por fagocitosis de los macrófagos, llevando el mensaje antigénico a los linfocitos para estos formar así los anticuerpos contra los espermatozoides.

Los anticuerpos contra espermatozoides pueden mostrar un número de propiedades y ellos pueden ser detectados por varios métodos, esos métodos y propiedades han sido revisados (19), aunque tales anticuerpos habfan sido estudiados desde 1899. Los métodos de aglutinación fueron raramente usados durante los primeros años.

Las primeras aglutinaciones observadas por el método del microscopio, parece ser de Hnle y Chambers 1938; (9), quienes utilizaron la reacción de aglutinación en placa. Procesos similares fueron estudiados por Snell 1944.

Un estudio de espermaglutininas en ratón, después de la inmunización entre especies consanguíneas (5), se estudiaron en antisueros de un conejo para las células de las especies humanas.

Un proceso muy diferente fué introducido por Franklin y Dukes 1964 (7-6), y entonces adptados por Schwinmer, Ustay y --

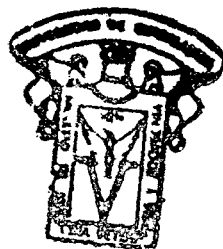
Berhamn en 1967, para anticuerpos estudiados en la mujer, en esta prueba la concentración de espermatozoides es bastante baja, siendo diluida 1:11 y las observaciones son hechas entre media y 4 horas después de la mezcla.

El método de aglutinación en gel ha sido puesto para usarse muy intensamente (17-16), y han descrito e ilustrado el método en detalle, este método también ha sido muy usado por Flocks en 1963 y Fjallbrant en 1965. Por este mismo A. C. Menge detectó las aglutininas específicas contra el espermatozoide, en el suero y en las secreciones vaginales y uterinas en las becerras isoinmunizadas (18-13).

Lanstciner 1899 (12), reportó que los espermatozoides eran antigénicos cuando encontró que los espermatozoides de toro rápido se inmovilizaban, cuando se inyectaban a la cavidad peritoneal de los cuyes que habían sido previamente inyectados parenteralmente con semen de toro. La antigenicidad del espermatozoide del toro fué confirmado por Metchikoff 1899-1900, quién busco aglutininas y anticuerpos espermoinmovilizantes. Henle y Chambers 1938, trabajando con espermatozoides de toro, demostraron antígenos específicos de la cabeza y de la cola mediante fijación de complemento y aglutinación en placa.

Si son o no los espermatozoides por si mismos antigénicos fué puesto a la luz de la duda por el trabajo de Weil y Finkler 1958, los cuales encontraron que en los cuyes con suero inmune contra --

plasma seminal de conejo y esperma de conejo fuertemente aglutina-
ban los espermatozoides del semen fresco; Lo mismo con los espermatozoides de
conejo lavados 3 veces. Los antígenos del espermatozoides del conejo y --
el plasma seminal estuvieron tan estrechamente ligados que no pu-
dieron ser diferenciados (10).



OFICINA DE
ASESORIA CIENTIFICA

OBJETIVO:

En México el reemplazo anual de ganado lechero (Hols-- tein, Jersey, Guernsey, Suiza y Ayrshire), tiene un promedio de -- un 33% y está determinado por diversos factores, los más importan-- tes son: trastornos reproductivos que representan el 58.89%, enfer-- medades infecciosas en un 13.1%, incosteabilidad económica en un - 7.88%. Dentro de los trastornos reproductivos que afectan a las-- explotaciones bovinas lecheras, esta la infertilidad que represen-- ta un 45.9% de las causas totales de desecho, lo cual produce gran-- des pérdidas al ganadero y que finalmente repercute en la economía del país (21-22). Estas pérdidas están ocasionadas por un período interparto mayor del normal que se traduce en un período abierto - muy prolongado; menor número de crías, menor producción láctea, -- así como gastos en alimentación, servicios médicos y de insemina-- ción.

La infertilidad está representada en gran parte por las vacas repetidoras que son las que no conciben después de 3 ó más -- servicios, que presentan estros regulares y que no tienen anomalías clínicas demostrables (15-22). Las principales causas de -- infertilidad son las siguientes:

1.- NUTRICIONALES.

- a) Esterilidad carencial o por hambre.
- b) Esterilidad por cebamiento.
- c) Elevado rendimiento de leche (bloqueo de ganado tropina).

2.- GENETICAS.

Como son anomalías y malformaciones en el ---
tracto genital o de los gametos.

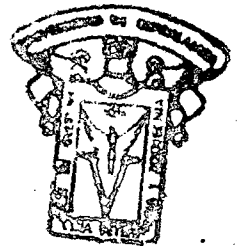
3.- Incapacidad concipiendi relacionada con la existen-
cia de causas mecánicas en tractus genital.

4.- Importancia fecundandi o concipiendi determinada -
por causas funcionales.

5.- Mala observación de calores y mal tiempo de la inse-
minación.

6.- Errores el procesamiento y manejo del semen.

7.- Presencia en el moco vaginal y en el suero sanguíneo
de anticuerpos contra espermatozoides. (21-13-22-4-
1).



OFICINA DE
ESTUDIOS GENÉTICOS

- MATERIAL Y METODOS -

MATERIAL BIOLÓGICO

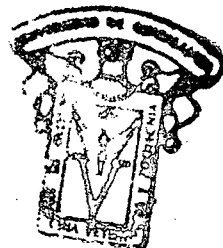
- 1.- Suero sanguíneo de 35 vacas repetidoras (que no concebían - después de 3 ó más servicios.
- 2.- Suero sanguíneo de 10 vacas no repetidoras (vacas de primer parto y que concibieron a la primera inseminación).
- 3.- Suero sanguíneo de 10 vacas vírgenes (termeras).
Todos estos sueros de vacas de la raza Holstein.
- 4.- Se utilizó como antígeno, semen congelado-descongelado de -- toros BOS TAURUS Y BOS INDICUS, con un promedio de 20×10^6 es permatozoides por ml.

MATERIAL REACTIVO

- 1.- Solución Buffer de Baker.
 - a.- 30 gr. de glucosa.
 - b.- 1.7 gr. de Na $2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (hidrofósforo sódico).
 - c.- 2 gr. Na Cl. (cloruro de sodio).
 - d.- 0.1 gr. KH_2PO_4 de hidrofósforo potásico.
 - e.- Agua destilada C.B.P. 1.000 ml.

MATERIAL DE LABORATORIO

Se empleó el material necesario para estas determinaciones, con el cual contamos con el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara.



FILINA DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

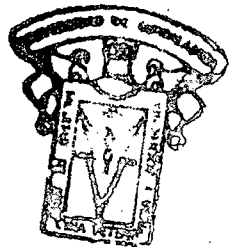
M E T O D O

- 1.- Primeramente se utilizaron sueros de 35 vacas Hostein -- repetidoras (se consideran repetidoras después de 3 ó más servicios). La muestra se obtuvo por punción yugular, -- aproximadamente 10 c.c. de sangre y depositada en tubos de ensayo. Esta en el laboratorio fué centrifugada a 3,000 - R.P.M., durante 10 minutos para obtener 1.5 c.c., de suero y se vació en tubos limpios, mezclándose después con 2.1 - c.c., de solución BUFFER DE BAKER y 200 microlitros de semen congelado-descongelado Hostein (BOS TAURUS), diluido - con citrato yema de huevo y glicerol a una concentración - aproximada de 20×10^6 espermias por mililitro. Si se uti liza semen fresco se hace la dilución de 20×10^6 espermias por mililitro con solución BUFRER DE BAKER.

- 2.- Los tubos que contenfan la mezcla, se sellaron con papel - para film y se agitaron, luego se incubaron durante 20 --- minutos a 37°C. para hacer las objservaciones y detectar - los anticuerpos seroespermoagutinantes; se agitaron los - tubos, se tomó una gota de la muestra y se depositó en un portaobjeto (libre de grasa), posteriormente se hizo la -- lectura al microscopio.

- 3.- Las aglutinaciones de más de 10 espermatozoides se tomó -- como positivo. Con la misma técnica se trabajaron muestras de 10 terneras (sin ningún contacto anterior con espermias).

- 4.- También se muestrearon 10 vacas no repetidoras; 6 con menos de 3 meses de gestación y 4 con 7 meses de gestación aproximadamente.
- 5.- Las vacas que reaccionaron positivamente fueron muestreadas 2 veces para hacer la comparación con semen de toros cebú - (BOS INDICUS).
- 6.- Las pruebas se llevaron a cabo en el mismo día que se obtienen las muestras con un tiempo no más de 6 horas.



OFICINA DE
FUSIÓN CIENTÍFICA

- RESULTADOS -

El suero de 35 vacas Holstein repetidoras fué examinado de las cuales 29 fueron positivas a la seroespermoaglutinación, (tablas 1-2) y 6 resultaron negativas (tabla 3), todas de 3-15 veces repetidoras, un promedio de 6.4 servicios.

Se hizo una semicuantificación tomándose como:

Bajo (X)

Medio (XX)

Elevado (XXX)

También se hicieron las determinaciones en el suero de 10 vacas Holstein no repetidoras. En este grupo 6 fueron positivas y con una gestación de menos de 3 meses, las otras 4 fueron negativas, con gestación de 7 meses aproximadamente (tabla 4).

Para corroborar otras teorías (4-11), en las 6 no repetidoras positivas, se utilizó semen congelado-descongelado de toros Cebú Gir (BOS INDICUS), no obteniéndose en esta prueba reacción positiva (tabla 4).

Todas las otras muestras se trabajaron con semen congelado-descongelado de toros Holstein (BOS TAURUS). El semen en todas las pruebas se utilizó como antígeno.

Por último se utilizó un lote testigo de 10 terneras (vaquillas vírgenes) resultando éstas, todas negativas a la seroespermoaglutinación.

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA
ESPERMATOZOIDES EN SUERO SANGUINEO

Vacas problema	Aglutinación	veces que repitió
923	XXX	5
720	XXX	9
1190	XXX	14
212	XXX	9
332	XXX	14
335	XXX	15
493	XXX	7
416	XXX	8
614	XXX	12
461	XXX	7
1134	XXX	0
707	XXX	5
704	XXX	7
514	XXX	9

(-) Negativo.
(x) Bajo.
(xx) Mediano.
(xxx) Elevado.

TABLA # 2

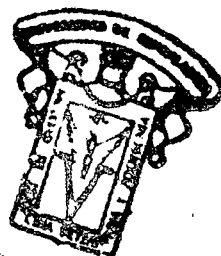
DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA
ESPERMATOZOIDES EN SUERO SANGUINEO.

Vacas problema	aglutinación	veces que repitió
1147	XX	7
549	XX	5
791	XX	3
560	XX	6
59	XX	3
940	XX	3
27	XX	7
910	X	2
211	X	4
219	X	4
499	X	6
954	X	8
922	X	3
758	X	6
724	X	3

TABLA # 3

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA
ESPERMATOZOIDES EN SUERO SANGUINEO.

Vacas problema	aglutinación	veces que repitió.
1016	-	3
928	-	3
1145	-	6
102	-	3
1129	-	7
53	-	3



OFICINA DE
DIVISION CIENTIFICA

TABLA # 4

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA ESPERMATOZOIDES
EN SUERO SANGUINEO

Lote de 10 vacas no repetidoras

Vacas muestreadas	gestación menos de 3 meses	gestación de aproximadamente 7 meses	se utilizó suero de Bos Indicus.
1	+		-
2	+		-
3	+		-
11	+		-
14	+		-
20	+		-
905		-	
1055		-	
918		-	
1297		-	

(-) Negativo.

(+) Positivo.

- DISCUSSION -



ACADEMIA DE
CIENCIAS

Esta detección fué llevada a cabo por la técnica de -- microespermoaglutinación; FRANKLIN y DUKES (14), la cual se eligió por ser la que más se adapta a un diagnóstico rápido; el que debe ser llevado a cabo el mismo día que se obtienen las muestras; debe ser suero fresco y semen fresco o congelado-descongelado.

Fribert 1974 (9), ha probado dar por medio de esta téc nica los mejores resultados; aunque en la espermoaglutinación ocurre un límite arbitrario más bajo para reacciones positivas. Las técnicas empleadas hasta el momento no nos permiten asegurar el -- más alto grado de pureza antigénica en los materiales ensayados, - pero sí tienden a insinuar que los antígenos responsables de los an ticuerpos inmovilizantes son de carácter proteico.

Otras técnicas fueron probadas; como la de aglutinación en placa y la de capilaridad; pero no nos dieron resultados favorables.

El semen que se utilizó como antígeno fué congelado-descongelado y no semen fresco, por haber tenido ciertos inconvenientes en disponer de toros para hacer las recolecciones necesarias, - así como facilitar estas técnicas para las detecciones prácticas del laboratorio. Además los espermas utilizados fueron móviles como - se lleva a cabo en la microespermoaglutinación de (F.D.), aunque - Shulman 1971 (20) a tenido éxito con espermatozoides inmóviles en - una prueba de capilaridad.

En las 35 determinaciones que se hicieron; 29 fueron - positivas y 6 negativas. También se detectaron los anticuerpos - seroespermoaglutinantes en vacas no repetidoras, por lo que se puede demostrar que una hembra expuesta a espermatozoides, de hecho - puede tenerlos. Sería importante hacer la titulación que lógicamente debe estar baja en estos casos. Se nos aclara esta duda con el trabajo realizado por Pérez y Pérez, en colaboración con el Doctor Garcia Alfonso (4); mencionan en su trabajo que la capacidad -- fecundante únicamente se altera cuando los señalados anticuerpos -- adquieren en el suero sanguíneo una concentración superior al 1:200 y que la infecundidad absoluta, aunque temporal, únicamente se consigue tras la administración de 10 inoculaciones y a partir de los 30 días de la última inoculación.

Otro estudio para determinar las funciones de deposición vaginal repetida de semen, en el mantenimiento de títulos de anticuerpos aglutinantes de semen: 29 parejas fueron persuadidas a usar preservativos exclusivamente o abstenerse de relaciones por un período de 1 año.

El título de anticuerpos disminuyó en todas las 29 mujeres y bajó a niveles no detectables en 25. De esas 25 mujeres; 8 perdieron los anticuerpos en 2 meses, 5 en 4 meses, 5 en 6 meses y las 7 restantes en 12 meses. De las 29 parejas quienes participaron en esta parte del estudio, 4 pacientes continuaron manteniendo niveles de anticuerpos circulantes aún después de 1 año de terapia. De las 25 pacientes en las cuales los anticuerpos desapare-

cieron, 20 llegaron a embarazarse cuando las relaciones sexuales - fueron resumidas a el tiempo próximo a la ovulación, 3 pacientes - no llegaron a embarazarse durante un período continuo de 12 meses y 2 pacientes desistieron en continuar (F. y D.) (3).

La evaluación de estas pruebas fueron semi-cuantitati- vas y se tomaron las aglutinaciones de más de 10 espermatozoides - como positivo. Muchos autores utilizan aglutinaciones del 10% co mo su límite, algunos revuelven la mezcla de la incubación antes - de poner una gota en la laminilla , otros toman una gota del fondo del tubo y algunos autores obtienen que la aglutinación de más de 10 espermatozoides lo toman como positivo.

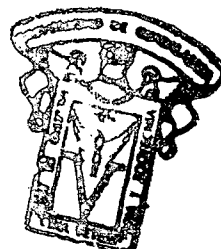
Hay varias condiciones que favorecen la presentación de la respuesta inmunológica humoral contra los espermatozoides.

- 1.- La isoimmunización, que se presenta el inseminar - vacas recién paridas y que por lo tanto no presen- tan aún la involución uterina.
- 2.- El inseminar vacas cuando sufren endometritis latente crónica.
- 3.- La inseminación de vacas cuando presenta metrorra-gias (2).
- 4.- Inmunización espermática, favorecida sin duda, por ciertas lesiones traumáticas que se desarrollan du

rante el acto de la inseminación (pinzado). Estas lesiones pueden favorecer la reabsorción del esperma (paso del antígeno) (4).

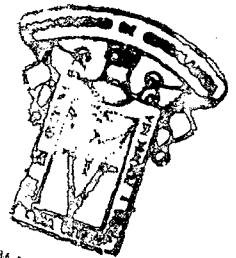
En estos casos antes mencionados hay alteraciones de las mucosas uterinas, lo que ocasiona una gran afluencia de macrófagos a la zona y los que al fagocitar al espermatozoide constituyen el primer paso requerido para que se presente la respuesta inmunológica (2).

Se ha demostrado que el antígeno de espermatozoides es específico de especie. Ha esto se puede deber el porque los anticuerpos producidos contra espermatozoides de Holstein (BOS TAURUS), no sean capaces de reaccionar contra los espermatozoides de Cebú (BOS INDICUS) (11). Según esta teoría puede observarse en la tabla 3 4, como las vacas que reaccionaron positivo a espermatozoides de BOS TAURUS fueron negativas al reaccionar con semen de BOS INDICUS.



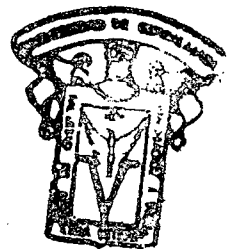
OFICINA DE
ESTADÍSTICA Y CONTROL

- CONCLUSIONES -



JACHER OF
REVISIONS OFFICERS

- 1.- Los anticuerpos contra espermatozoides afectan ocasionando -
infertilidad temporal.
- 2.- Pueden detectarse aún en vacas normalmente fértiles.
- 3.- Las vacas con mayor tiempo de no exposición a los espermatozoides,
pierden los anticuerpos.
- 4.- Las vacas aún no repetidoras, habiendo estado expuestas a un
estímulo antigénico espermático, pueden ser positivas a la -
prueba.
- 5.- En animales que tienen mayor número de servicios, las agluti-
naciones son más evidentes.
- 6.- En lugar de dar servicios continuos (en vacas repetidoras) es
mejor dar un lapso de tiempo, dejando pasar unos 4 períodos -
de estro, para que bajen los títulos y pueden haber mayores -
posibilidades de que conciba.
- 7.- En las vacas repetidoras expuestas a semen de Holslein (BOS -
TAURUS) se recomienda cambiarse a toros cebú (BOS INDICUS) --
para incrementar las posibilidades de concepción.



- S U M A R I O -

El propósito de este trabajo, fué el de detectar los anticuerpos contra espermatozoides en suero sanguíneo de vacas repetidoras de la raza Holstein, utilizando como antígeno los espermias de toros Holstein (BOS TAURUS) y el de toros Cebú (BOS INDICUS).

Se demostró también que el suero de vacas no repetidoras positivas al antígeno de Holstein (BOS TAURUS) no reaccionó a la prueba; utilizando antígeno de toros cebú (BOS INDICUS).

Para esta determinación de anticuerpos contra espermatozoides se utilizó la prueba de microsespermoaglutinación.

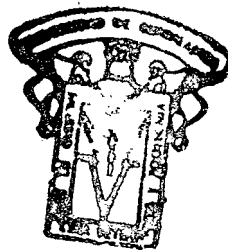
Se trabajaron 35 muestras de suero sanguíneo en vacas repetidoras (animales que presentaban más de 3 servicios), también un lote de 10 vacas no repetidoras; 6 con gestación de menos de 3 meses y 4 con gestación de aproximadamente 7 meses. El último lote fué de 10 terneras (vaquillas vírgenes).

De las 35 vacas repetidoras; 29 fueron positivas y 6 negativas.

De las 10 vacas no repetidoras, las que tenían gestación de menos de 3 meses fueron positivas, estas al cambiarse de antígeno BOS TAURUS POR BOS INDICUS, la reacción fué negativa. Las otras 4 de gestación avanzada fueron negativas.

Las terneras, todas fueron negativas a la seroespermoaglutinación.

El semen BOS INDICUS, se utilizó solo para las vacas no repetidoras positivas, reaccionando negativas a la aglutinación.



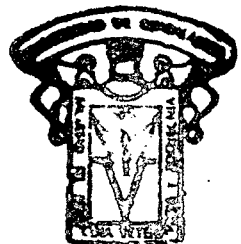
OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

- BIBLIOGRAFIA -

- 1.- Benesch; Obstetricia Veterinaria;-- "Esterilidad en la vaca"
Barcelona, Labor, 1975; p. 644-650
- 2.- Bratanov, K; Immunology of Sterility; Memorias del VI congre-
so internacional de reproducción animal e inseminación ar-
tificial; -- Paris, Francia; 1968, p. 497-410.
- 3.- Dean, Dukes, C. (et. al.); Sperm. agglutinins and human - -
infertility female. --- Fert. Steril. -- v. 19:1968, p. -
263-267.
- 4.- Pérez y Perez, Felix. Reproducción e inseminación artificial
ganadera,--- Estudio de la infecundidad determinada por --
impotencia concipiendi coexistente con gametogénesis nor--
mal; --- Barcelona, Científico-Médica, 1966; p. 657-633.
- 5.- Flooks, R. J. (et. al.). Studies on spermagglutinating. An-
tibodies in antibumen prostate sera; --- J. Urol; 87: 1962;
p. 475.
- 6.- Robert, F. and D. Dukes; Further on spermagglutinating anti--
body and unexplained infertility. --- J. Am. Med. Ass 90:
1964, p. 683.
- 7.- Robert, F. and K. Dukes; Antiespermatozoal antibody and unex-
ploained infertility; --- J. Am. Obstet. Ginec. 89: 1964,
p. 6.
- 8.- Friberg, J. Clinical and immunological studies on sperm agglu-
tinationg antibodies in sera and seminal fluid. -- Obstet.
Ginec. Scand; --- suppl, v 36: 1964; p. 3-76.

- 9.- Hnle, (et. al.); Studies on the antigenic structure of -- some mamalian espermatozoa; --- J. Esp. Med. 68: 1938, p. 335.
- 10.- Hunter, A. G. (et. al.); Antigenicity and cross. Reactions of Bovine spermatozoa; --- J. Reprod. Fert. 7: 1904; -- p. 357-365.
- 11.- Katsh, S. and Katsn, F. F.; Antigenicity of spermatozoa; -- J. Fert. Steril. 12: 1961, p. 522-537.
- 12.- Landsteiner, K. Zur kenutnis derspezifisch daf blütkorperchen wirkenden sera centrable; --- F. Barkt. v.25: 1899; p.546.
- 13.- Menge, A. C. Induced infertility in cattle by; --- J. Reprod Fert. 13: 1907, p. 445-456.
- 14.- Mettler, L. (et. al.); Dificulty of obtaining reproducibili- ty in the Franklin and Dukes tes for the detección of - - sperm agglutinating antibodies in human sera; --- J. Re- prod. Fert. 44: 1975, p. 217-221.
- 15.- Ruíz, D. R. El problema de la vaca repetidora. Memorias del primer simposium nacional de reproducción animal México, D. F. 1969, p. 55-68.
- 16.- Rumke, P. The presence of sperm antibodies in the serum of - two paients with; --- Oligozoos permiavax sang; v. 4: 1954 p. 135.
- 17.- Rumke, P. Autospermagglutinins, a cause of infertility in - men; --- Ann V. y Acad. Sci; 1965, p. 124-696.

- 18.- Shulman, S. (et. al.). Antibodies to spermatozoa II spermagglutination techniques for Guinea pig and human cells; J. Reprod. Fert. 27: 1971; p. 31-41.
- 19.- Shulman, S. Antigenicity and autoimmunity in sexual reproduction; --- Review Clin. Exp. Immun; v. 9: 1971; p.267.
- 20.- Shulman, S. Sperm antibodies as a cause of infertility Crc; Crit. Rev. Lab. Sci; v. 2: 1971, p. 393-460.
- 21.- Talavera, de la Fuente y Barruecos. Pérdidas económicas -- por problemas reproductores. III Edad y causas por las que son desechadas en México las vacas lecheras estabuladas; --- Técnica pecuaria en México; v. 24: 1973; - - p. 21-32.
- 22.- Zemjanis, R. The problem of repeat breeding in cattle; -- Conferencia dictada en los Laboratorios Norden, S. A. México, D. F. 1962.



OFICINA DE
CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS