

121  
2 of



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“COMPARACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA Y ANORMALIDADES DE LOS ESPERMATOZOIDES DE CARNERO DE LA RAZA MERINO AUSTRALIANO, ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION EN PELLETS EN TRES DIFERENTES DILUENTES”.

## T E S I S

Para obtener el Titulo de  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

presentada por:

**MOISES PEÑA VERDUZCO**  
**FRANCISCO MELESIO ARROYO**

Asesor: **ARTURO A. TREJO GONZALEZ**



V N A M

Cuautitlán Izcallí, Edo. de México.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	5
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS Y DISCUSION.....	9
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	15
ANEXOS.....	16
BIBLIOGRAFIA.....	19

## INTRODUCCION

La reproducción artificial en ovinos es una herramienta potencialmente útil para ampliar la propagación del material genético de los carneros de alta calidad. Ultimamente ha existido un necesario crecimiento en la inseminación artificial de los ovinos en muchos Países que están en vías de desarrollo, donde se importan pocos carneros superiores para el mejoramiento de la genética de los rebaños criollos.

Pese a las grandes ventajas de la inseminación artificial en los animales domésticos de importancia económica, es esencial una restricción racional en la aplicación de la inseminación artificial a grandes poblaciones, si no se tiene la plena seguridad de que los sementales han sido seleccionados por los métodos genéticos adecuados, ya que, así como se puede lograr un mejoramiento genético, también se puede distribuir, ampliamente, material genético inferior (Faulkner y Pineda 1977).

En especies de reproducción estacional como los ovinos, una ventaja en la conservación del sémen, es que puede almacenarse en la estación reproductiva, cuando éste se produce de mejor calidad y puede ser aplicado en cualquier época a las ovejás. (Rao y Pandey, 1977). Sin embargo la conservación del sémen de ovino ha tenido dificultades dado que presenta bajos porcentajes de motilidad después de congelado, que se reflejan en índices bajos de fertilidad. (Durán del Campo, 1980)

Lighfoot y Salamon (1970); Mattner, Entwistle y Martin (1969) y Watson y Martin (1972)., citados por Tasseron, Amir Schindler (1977), señalan que la baja fertilidad del sémen congelado es debida a fallas en el transporte espermático en la hembra, a una reducción de la motilidad espermática en el tracto genital de la hembra y en mínima parte, al daño acrosomal causado por el congelado.

Desde hace más de 20 años se han venido haciendo investigaciones en el almacenamiento del semen congelado de carnero, en general se ha seguido la misma técnica que con el semen de toro. (Visser D. 1974 a).

Se han hecho investigaciones para observar el efecto de los diferentes diluentes y temperaturas de descongelado (Visser, 1974 a), métodos de congelado y grados de dilución (Visser, 1974 b), entre otros factores, como responsables de las alteraciones del esperma de carnero al descongelado.

En cuanto al diluyente, se há visto que la yema huevo tiene un importante papel en la motilidad espermática al descongelar, ya que el incremento de los niveles de yema de huevo, mejoró significativamente la motilidad espermática del semen diluido 1:4 y refrigerado a 5°C durante 3 días. (Adelhankeam et. al. 1978; Watson y Martin, 1973).

Comparando la motilidad espermática del semen diluido a base de Glucosa y a base de Tris, y almacenados a 5°C durante tres días, se vió que el promedio general de motilidad espermática fué significativamente superior en el medio de Tris que en el de Glucosa, lo cual puede proponer al medio a base de Tris-Yema-Glicerol, como el medio indicado para semen de carnero. (Abdelhankeam et. al. 1978).

Se há estudiado también la concentración de glicerol y lactosa en el medio de dilución, encontrandose que usando un 5% de glicerol, se obtuvieron mejores porcentajes de motilidad que cuando se usó al 3.5%, así como también fué mayor la motilidad, usando lactosa al 11% que cuando se usó al 9%. En el mismo experimento se pudo ver que tiene una mayor influencia sobre la motilidad espermática al desconge-

lado, el tipo de diluyente, que el tipo de solución descongelante. (Roy Choundhury y Bhambhani, 1977).

El tipo y concentración de azúcar, contenidas en el diluyente, tienen también un papel muy importante en la supervivencia espermática, obteniéndose mejores resultados cuando se utiliza glucosa que cuando se usa lactosa, rafinosa o fructosa. El mejor resultado se obtuvo usando un diluyente a base de Tris. (Salamon y Visser, 1972).

Por otro lado se ha visto que la yema de huevo presenta un factor que es capaz de causar alteraciones en el acrosoma (Watson y Martin, 1973), además se ha observado también que los espermatozoides sufren daño del acrosoma durante todos los estados de dilución, enfriado, congelado y descongelado, teniendo un alto porcentaje de daños en las fases de dilución y enfriado, hecho que sugiere la necesidad del mejoramiento del diluyente. (Tasseron et. al. 1977).

También se ha observado el efecto del volumen del pellet, temperatura de descongelación y grado de dilución al descongelado sobre el porcentaje de anomalías acrosómicas y porcentaje de motilidad. Se encontró que el volumen del pellet y la temperatura al descongelado tienen una pequeña influencia en el acrosoma de las células descongeladas, mientras que el grado de dilución al descongelado y el tiempo de incubación, tuvieron efectos significativos en la proporción de células con anomalías del acrosoma. (Visser, 1974 b).

En lo que se refiere a las anomalías primarias, ningún autor reporta diferencias significativas antes y después del congelado, lo que sugiere que estas anomalías son de tipo genético y de frecuencia constante en cada individuo (Ramírez, 1982), aunque también se dice que son debi-

das a fallas en el proceso espermatogénico. (Medway, et.al. 1973; Zemjanis, 1980; Sorensen, 1979).

Las anomalías secundarias, se supone que aparecen durante el paso de los espermatozoides por el sistema de conductos después de salir de los túbulos seminíferos y del testículo (Medway, 1973; Zemjanis, 1980; Sorensen, 1979), aunque también son atribuidas a causas ambientales y manejo inadecuado del semen (Medway, 1973), y se ha visto que tienen un ligero incremento después de la congelación (Sahni y Roy, - 1973; Ramírez, 1982).

El presente trabajo se encaminó a comparar la motilidad progresiva y las anomalías primarias, secundarias y del a cromosoma antes y después del congelado del semen ovino, en forma de pellets utilizando tres diferentes diluentes, con la finalidad de comparar el efecto de dichos diluentes sobre el esperma de carnero.

## OBJETIVOS

- 1.- Comparar la motilidad progresiva antes de la congelación y después de 8 días de almacenamiento en nitrógeno líquido, del semen diluido en tres diferentes diluentes para pellets.
- 2.- Comparar el porcentaje de anormalidades acrosómicas - antes y después del congelado del semen de carnero en tres diferentes diluentes para pellets.
- 3.- Comparar el porcentaje de anormalidades primarias y secundarias de los espermatozoides antes y después de la congelación con tres diferentes diluentes para pellets en carneros de la raza Merino Australiano.
- 4.- Colaborar en la investigación para encontrar la metodología y materiales necesarios para aprovechar al máximo el potencial genético de los sementales importados, usando los conocimientos y técnicas de la inseminación artificial existentes en nuestro País y aplicables a la especie ovina.



## MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en los meses de Mayo, Junio y Julio de 1983 en el "Centro Regional de Fomento y Capacitación Ganadera Ovina", de la Secretaría de Recursos Hidraulicos, ubicado en Chapa de Mota, Edo. de México que se localiza a 2400 metros sobre el nivel del mar y a 19° 46' de latitud norte y a 99° 29' de Longitud poniente.

Mediante el método de la vagina artificial se obtuvieron 50 muestras de semen de cinco borregos, con una concentración promedio de 2000 millones de espermatozoides por mililitro, un promedio de 70.6 % (70.6+14.05) (30-90%) de motilidad progresiva, y un volúmen promedio de 0.79 mililitros, los cinco borregos fueron escogidos al azar de un lote de 60 sementales de la raza Merino Australiano.

Se utilizaron vaginas artificiales de 15 centímetros de largo y 5 centímetros de diámetro, con fundas y conos desechables de polietileno, la presión se logró mediante el llenado completo de la vagina con agua caliente, que a su vez, nos proporcionó la temperatura, la cual se mantuvo entre 42 y 44° C.

Los conos de polietileno conectaban a la vagina con tubos de vidrio para centrífuga, graduados de 1 a 10 mililitros en los que se obtuvo directamente el semen, estos tubos estuvieron protegidos de la luz y se conservaron a 37°C durante la recolección, en estos mismos tubos se midió directamente el volúmen de la muestra.

Cada muestra se conservó en baño maría entre 30 y 35°C, mientras se hacía la evaluación del semen antes de efectuar su dilución.

La concentración espermática por mililitro fué medida por espectrofotómetro previamente calibrado con una longitud - de onda de 600 nanómetros, para semen diluido 1:100 en citrato de sodio al 2.9 % (Ibarguengoitia, 1982).

La motilidad progresiva se calculó en el momento de la ob tención de la muestra, diluyendo 0.1 mililitros de semen - en 9.9 mililitros de citrato de sodio al 2.9 % y a una tem peratura de 37° C. Su evaluación se hizo en porcentaje ob servando tres campos al microscopio de luz, de acuerdo con Zemjanis (1980).

Una vez realizadas las evaluaciones anteriores se procedió a realizar para cada muestra dos frotis del semen, uno teñido con oesina-nigrosina (Sahni y Roy, 1972) (anexo 1), - para ver las anomalías primarias y secundarias y el o tro teñido por el método de Wells-Awa (anexo 2), para ver las anomalías acrosómicas. (Wells y Awa, 1970).

Cada muestra fué dividida en tres partes iguales, cada una de estas partes se diluyó en proporción 1:4 (v/v) en un di ferente diluyente para semen, los cuáles fuéron a base de - Tris-Glucosa (anexo 3), Glucosa (anexo 3), y Lactosa (Ane- xo 3), dichas diluciones se hicieron de 31 a 35°C.

La identificación de cada uno de los diluyentes se logró me diante la adición de una pequeña gotita de diferentes co lorantes naturales.

Cada muestra una vez diluida se sometió a un período de a daptación conservandose en refrigeración entre 5 y 10° du- rante una hora. (Visser, 1974b). Después de este período - de adaptación se procedió al congelado en forma de pellets de 0.1 mililitro, sobre una placa perforada de bióxido de carbono sólido (hielo seco), alcanzando una temperatura a

proximada de  $-79^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

Una vez congelados los pellets, cada grupo de los mismos - fué identificado con el número progresivo correspondiente y colocado en recipientes plásticos de los utilizados para almacenar las pajillas de semen congelado de toro, se guardaron en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), durante 8 días.

De cada muestra se descongelaron 9 pellets (tres para cada diluyente), utilizando como solución descongelante, 9.9 mililitros de citrato de sodio al 2.9 % y a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

La evaluación de la motilidad y los frotis para identificar las anormalidades primarias y secundarias y del acrosoma después del congelado y descongelado, se realizaron inmediatamente después de haber descongelado, haciendo dos frotis por cada diluyente (6 frotis por muestra).

La evaluación de las anormalidades se hizo microscopicamente con el objetivo de inmersión, contando 200 espermatozoides para el caso de anormalidades primarias y secundarias (Sorensen 1979) y 100 espermatozoides para las anormalida-des acrosómicas, el resultado se expresó en porcentaje, considerando cada una de las anormalidades descritas por Zem-janis (1980).

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el método de análisis de varianza por mínimos cuadrados, en un arreglo de 50 bloques y cuatro tratamientos de acuerdo a Steel y Torrie (1980).

## RESULTADOS Y DISCUSION

El porcentaje de motilidad espermática después del congelado, fué ligeramente superior con el diluyente a base de Tris ( $28.21 \pm 12.55$ ), que con Glucosa ( $23.86 \pm 9.79$ ) o Lactosa ( $25.71 \pm 10.77$ ), sin embargo esta diferencia no fué estadísticamente significativa (Cuadros 1 y 2). Los valores obtenidos para la motilidad en el presente estudio para el diluyente a base de Tris concuerdan con los valores obtenidos por Salamon y Visser en 1972 (30.8-34.5), la ligera diferencia existente, puede atribuirse al diferente tipo de solución - descongelante, por otro lado, los valores obtenidos son sensiblemente superiores a los encontrados por Ramírez (1982) (19.4 %). lo que podría deberse al uso de diferentes diluyentes y a variaciones en el manejo de las muestras.

El promedio de motilidad individual del semen fresco fué 70.6 %, valor considerablemente mayor al encontrado para cada uno de los diluyentes después de descongelar y estadísticamente significativo por igual para los tres diluyentes utilizados. (cuadros 1 y 2).

La diferencia entre el porcentaje de anomalías acrosómicas antes y después del congelado fué estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). En las muestras congeladas el Tris y la Glucosa no mostraron diferencia significativa entre ellas pero si fueron diferentes a la lactosa ( $P < 0.05$ ).

Los daños acrosómicos evaluados fueron; acrosoma hinchado, acrosoma roto y ausencia de acrosoma, los valores encontrados para el semen fresco fueron inferiores a los encontrados por Tasserón et.al.(1977) ( $8.0 \pm 0.4$ ), esto puede deberse primero a los diferentes tipos de daños evaluados y a diferencia de apreciación individual. En el caso de los valores

encontrados después de la congelación, la diferencia es grande con respecto a dicho autor ( $6.43 \pm 3.5$  como promedio, contra  $39.8 \pm 0.7$  respectivamente), y puede deberse a que los diluentes usados en uno y otro caso fueron diferentes. Visser D. (1974b), considerando las alteraciones acrosómicas al congelado recomienda tener en mente estos daños cuando el semen vaya a ser usado para inseminación artificial, ya que dichos daños pueden ser los responsables de un efecto depresivo en la fertilidad de las células descongeladas y de la modificación de los volúmenes de inseminación y concentración que deben ser necesariamente compensados por esa pérdida de células intactas.

En lo que respecta a anomalías primarias se encontró un valor ligeramente mayor antes que después del congelado en cualquiera de los tres diluentes usados, esta diferencia no fué estadísticamente significativa, así como tampoco lo fué la diferencia entre cada uno de los diluentes (tablas 1 y 4), estos resultados son aceptables ya que sabemos que este tipo de anomalías son de carácter genético y de frecuencia constante (Zemjanis 1980; Faulkner y Pineda) y no se han reportado diferencias significativas en este parámetro.

Los valores obtenidos en el porcentaje de anomalías secundarias tuvieron diferencias mínimas antes y después de congelar el semen, dichas diferencias no son estadísticamente significativas (tablas 1 y 5) y difieren con las encontradas por Ramírez (1982), quién encontró valores ligeramente superiores después de la congelación (26.1% antes y 29.3% después de congelado).

En este trabajo se eligió el método de congelado en pellets tomando en cuenta trabajos anteriores en los que fué comparado contra el método de congelado en pajillas (Maxwell W. M. C. et. al. 1980), quienes encontraron una ligera diferencia en favor del semen congelado en pellets para el índice de partos, por otro lado Salamon (1967), citado por Colas - G. (1980), señala que si bien la diferencia no es significativa en este parámetro entre ambos métodos, el congelado en pellets tiene la ventaja de ser un método simple, rápido y consecuentemente económico.

# CUADRO N° 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SEMEN DE CARNERO MERINO AUSTRALIANO,  
 ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION EN PASTILLAS (pellets). EN -  
 TRES DIFERENTES DILUENTES.

	FRESCO	C O N G E L A D O		
		TRIS	GLUCOSA	LACTOSA
Motilidad progresiva (%)	70.60±14.05 (a)	28.21±12.55 (b)	23.86±9.79 (b)	25.71±10.77 (b)
Anormalidades del acrosoma (%)	4.61± 3.78 (a)	6.06± 4.01 (c)	5.95±3.07 (c)	7.30± 3.44 (b)
Anormalidades Primarias (%)	0.66± 1.14 (a)	0.51± 1.19 (a)	0.31±0.53 (a)	0.51± 1.24 (a)
Anormalidades Secundarias (%)	5.36± 5.97 (a)	5.47± 3.93 (a)	3.71±2.97 (a)	5.35± 4.25 (a)

LETRAS DIFERENTES EN LOS RENGLONES MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

% de Motilidad progresiva (a - b=P<0.01)

% de Anormalidades acrosómicas (a-b=P<0.01) (a-c'=P<0.01) (a-c=P<0.05)  
 (b-c=P<0.05) (b-c'=P<0.05)

## CUADRO Nº 2

RESULTADO DE ANOVA PARA LA MOTILIDAD PROGRESIVA DEL SEMEN DE CARNERO MERINO AUSTRALIANO ANTES Y DESPUES DE LA CONFELACION EN PASTILLAS EN TRES DIFERENTES DILUENTES.

	F. V.	G.L.	S. C.	C. M.	F.
TOTAL		199	103,101.32	---	---
TRATAMIENTOS		3	75,312.04	25,104.01	206.94 (**)
BLOQUES		49	9,955.51	203.17	1.67 (**)
ERROR		147	17,833.77	121.31	---

(\*\*) =  $P < 0.01$

## CUADRO Nº 3

RESULTADO DE ANOVA PARA LAS ANORMALIDADES ACROSO MICAS DEL SEMEN DE CARNERO MERINO AUSTRALIANO ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION EN PASTILLAS EN TRES DIFERENTES DILUENTES.

	F. V.	G.L.	S.C.	C. M.	F.
TOTAL		199	2,717.86	---	---
TRATAMIENTOS		3	181.21	60.40	5.71(**)
BLOQUES		49	982.78	20.05	1.89(**)
ERROR		147	1,533.87	10.57	---

(\*\*) =  $P < 0.01$



## CUADRO N° 4

RESULTADO DE ANOVA PARA LAS ANORMALIDADES PRIMARIAS DEL SEMEN DE CARNERO MERINO AUSTRALIANO ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION EN PASTILLAS EN TRES DIFERENTES DILUENTES.

F. V.	G.L.	S. C.	C.M.	F.
TOTAL	199	228.94	---	---
TRATAMIENTOS	3	3.09	1.03	0.86 (NS)
BLOQUES	49	49.77	1.01	0.84 (NS)
ERROR	147	176.08	1.19	---

(NS) = no significativo

## CUADRO N° 5

RESULTADO DE ANOVA PARA LAS ANORMALIDADES SECUNDARIAS DEL SEMEN DE CARNERO MERINO AUSTRALIANO ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION EN PASTILLAS EN TRES DIFERENTES DILUENTES.

F. V.	G.L.	S. C.	C.M.	F.
TOTAL	199	3,877.81	---	---
TRATAMIENTOS	3	100.12	33.37	1.75 (NS)
BLOQUES	49	987.45	20.15	1.06 (NS)
ERROR	147	2,790.24	18.98	---

(NS) = no significativo

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es evidente que la motilidad progresiva es el parámetro sensiblemente más afectado en la congelación del semen y desafortunadamente el más importante en cuanto a la fertilidad del semen ya que se sabe es directamente proporcional a la misma (Zemjanis - 1980), en el presente trabajo se apreció que el medio de tris favorece ligeramente al semen congelado en cuanto a la motilidad, la cual ha sido superada en otros trabajos con el mismo diluyente por diversos autores. (Salamon y Visser, 1972; Abdelhankeam - et. al. 1978).

Las anormalidades acrosómicas son estadísticamente similares para los tres diluentes utilizados y son muy significativas respecto del semen fresco, por lo que se puede deducir que el daño es causado por el manejo del semen durante las etapas de colección, dilución, enfriado y congelado. Es indudable que estas lesiones acrosómicas afectan a la fertilidad del semen por lo que cabe sugerir compensar en la dosis de inseminación estos espermatozoides dañados mientras se logra encontrar una metodología de congelado que proteja esta parte primordial del espermatozoide.

Aún cuando nuestro país requiere de profesionistas más prácticos que ayuden a resolver de inmediato los problemas técnicos más sencillos que enfrenta nuestra ganadería actual, no debemos dejar olvidada la investigación ya que de lo contrario, siempre seremos dependientes del extranjero en cuanto a tecnología y material genético superior, por lo que se sugiere combinar los conocimientos prácticos con las investigaciones científicas, al respecto nos atrevemos a recomendar se sigan haciendo trabajos en nuestro medio relacionados con la conservación del semen en los ovinos.

## A N E X O "1"

TECNICA DE TINCION DE EOSINA-NIGROSINA PARA LA OBSERVACION DE LA MORFOLOGIA EN LOS ESPERMATOZOIDES DE CARNERO.

Solución acuosa de Nigrosina al 1%

Solución acuosa de eosina al 5%

Semen diluido 1:100 en citrato de sodio al 2.9%

Diluir el semen fresco en el citrato de sodio a una temperatura de 35-37°C, agregar sobre un portaobjetos cóncavo una gota de eosina, después una gota de semen diluido, enseguida dos gotas de nigrosina. Se mezcla agitando con un palillo, se deja transcurrir un minuto y finalmente se toma una gota de la mezcla y se realiza el frotis.

NOTA: Todas las soluciones y el material de cristalería deben estar a una temperatura de 35-37°C. Se obtienen mejores resultados utilizando pipetas Pasteur como goteros. (De Herrick J. B. y Self J. L., 1965; con modificaciones de Moss J. A. et al. 1979).

A N E X O "2"

TECNICA DE TINCION DE WELLS-AWA PARA LA OBSERVACION DE LA MORFOLOGIA DEL ACROSOMA EN LOS ESPERMATOZOIDES DE CARNERO.

Eosina B(88%), en solución acuosa al 1%-----	25 ml.
Verde Rápido (90%), en solución acuosa al 1%---	50 ml.
Alcohol Etílico-----	42.5 ml.
T O T A L	117.5 ml.

Semen diluido 1:100 en citrato de sodio al 2.9%

Una vez diluido el semen en el citrato de sodio a una temperatura de 35-37°C, agregar sobre un portaobjetos concavo una gota del semen ya diluido, enseguida una gota del colorante de Wells-Awa a una temperatura de 35-37°C. Se mezcla agitando con un pabillo, se espera un minuto y finalmente se toma una gota de la mezcla y se realiza el frotis. (Wells y Awa, 1970).

NOTA: El colorante, el semen diluido y el material de cristalería deben mantenerse a una temperatura de 35-37°C. Se obtienen mejores resultados utilizando pipetas Pasteur como goteros.

## A N E X O "3"

COMPOSICION DE LOS DIFERENTES DILUENTES UTILIZADOS  
EN EL PRESENTE TRABAJO

DILUENTE	1*	2	3
Tris 300 mM más			
Glucosa 2.75 mM	40.0 ml.	----	----
Glucosa al 7.5%	----	37.5 ml.	----
Lactosa al 11%	----	----	37.5 ml.
Yema de huevo	7.5 ml.	10.0 ml.	10.0 ml.
Glicerol	2.5 ml.	2.5 ml.	2.5 ml.
Penicilina 800,000 UI	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
Estreptomicina 1g	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
	50.2 ml.	50.2 ml.	50.2 ml.

\* El diluyente 1, a base de Tris, se ajustó a un Ph de 7.0 mediante la adición de gotas de una solución 1N de ácido cítrico.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Abdelhakeam S. M. T., Yassen A. M. and El-Alamy M. A. (1978)  
Ram sperm motility aged in glucose and tris buffered extenders at 5°C.  
Journal Agricultural Reseach., 26(2); 301-308.
- 2.- Colas G. (1980)  
9th. International Congress of animal Reproduction and Artificial Insemination 16th-20 th June, 1980.  
Madrid España, Editorial Garsi, 1980.
- 3.- Durán del Campo (1980)  
Anatomía y fisiología de la Reproducción e Inseminación artificial de los Ovinos.  
Editorial Hemisferio Sur, Uruguay, (1980)
- 4.- Faulkner L. C. y Pineda M. H. (1977)  
Inseminación artificial. McDonald (1977)  
Reproducción y Endocrinología Veterinarias, 2a. Edición Editorial Interamericana, México; 288-325.
- 5.- Fukui Y. (1979)  
Effects of different diluents, thawing temperatures and material of thawing container on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method.  
Japan J. Animal Reprod. 25;160-169
- 6.- Herrich J. B., and Self H. L., (1965)  
Evaluación de la Fertilidad del toro y del verraco.  
Editorial Acribia, Zaragoza España; 61-75

- 7.- Ibarquengoitia T. M. E. A. (1982)  
Técnica de calibración de un espectrofotómetro para determinar la concentración espermática en semen de carnero. Tesis profesional. UNAM-1982
  
- 8.- Maxwell W. M. C., Curnock R. M., Logue D. N., and Reed H. C. B. (1980).  
Fertility of ewes following Artificial Insemination with semen frozen in pellets or straws. A preliminary report.
  
- 9.- Medway, Prier and Wilkinson (1973)  
Patología Clínica Veterinaria.  
Editorial UTHEA: 506-519.
  
- 10.- Moss J. A., Melrose D. R., Reed H. C. B., and Valdeplasche M. (1979).  
Spermatozoa, Semen and Artificial Insemination, in fertility and infertility in domestic animal. 3th Ed.  
Balliere Tindall, U. K.; 59-91.
  
- 11.- Ramírez R. S. (1982)  
Evaluación de la motilidad y anomalías en los espermatozoides ovinos antes y después de la congelación del semen en pellets.  
Tesis profesional, UNAM-1982
  
- 12.- Rao B. R. and Pandey J. N. (1977)  
Preservation of semen of Corriedale and Mali rams in different diluents.  
Indian Journal Animal Sciences. 47(4); 193-196.
  
- 13.- Roy Choundhury P. N. and Bhambhani G. (1977)  
Pellet freezing of ram spermatozoa.  
ZBL. Vet. Med. A., 24;696-700.

- 14.- Sahni K. L. and Roy A., (1972)  
A note in seasonal variation in the occurrence of abnormal spermatozoa in different breeds of sheep and goat under -  
propical conditions.  
Indian J. Anim. Sci. 42-(7):501-A
- 15.- Salamon S. and Visser D. (1972)  
Effect of composition of Tris-based-diluent and of tawing  
solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pe-  
llet method.  
Aust. J. Biol. Sci., 1972, 25; 605-618
- 16.- Sorensen A. M. Jr. (1979)  
Animal Reproduction; principles and practices.  
Ed. Mc. Graw Hill Publications in the Agricultural Scien-  
ces. U. S. A.
- 17.- Steel R. G. D. and Torrie J. H. (1980)  
Principles and procedures of statistics a biometrical A-  
proach.  
2a. ed., Mc. Graw Hill, INC.
- 18.- Tasseron F., Amir D. and Schindler H., (1977)  
Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cool-  
ing and freezing.  
J. Reprod. Fert. 51; 461-462
- 19.- Watson P. F. and Martin I. C. A., (1973)  
Response of ram spermatozoa to preparations of eggolk in  
semen diluents during storage at 5 or -196°C.  
Aust. J. Biol. Sci. 26;927-935



- 20.- Wells M. E. and Awa O. A. (1970)  
New technique for assessing acrosomal Characteristics of spermatozoa.  
Journal of Dairy Science vol. 53 N<sup>o</sup> 2 p. 227-232
- 21.- Visser D. (1974a)  
Recent advances in the deep-freeze preservation of ram-  
sen.  
Afr. J. anim. Sci., 4, 275-288 (1974)
- 22.- Visser D. (1974b)  
The effect of pellet volume, dilution rates preezing  
and at thawing, and of thawing temperature on the survi-  
val and acrosome-morphology of frozen ram spermatozoa.  
S. Afr. J. Anim. Sci. 4; 147-155
- 23.- Zemjanis Raymond (1980)  
Reproducción Animal; diagnóstico y técnicas terapeuticas  
Ed. Limusa, México; 1980; 197-206