



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



EFFECTO DEL CONGELAMIENTO SOBRE LA
MOVILIDAD PROGRESIVA Y LA ESTRUCTURA ACROSOMAL
DEL ESPERMATOZOIDE DE MORUECO.

T E S I S

Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a
JORGE ANTONIO ORIZAGA VAZQUEZ DEL MERCADO

Asesor: M. V. Z. Gerardo Bustamante Curiel

1982



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.

INDICE GENERAL.

	<u>pagina.</u>
I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION.....	3
III.- MATERIAL Y METODOS.....	6
IV.- RESULTADOS.....	10
V.- DISCUSION.....	18
VI.- CONCLUSIONES.....	21
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	22

INDICE DE CUADROS.

<u>cuadro.</u>	<u>página.</u>
1. Promedios, desviaciones estandar y - coeficientes de variación de los re- sultados obtenidos de los eyaculados estudiados.....	12
2. Promedios parciales de los 4 moruecos.	13
3. Morueco #1: resultados obtenidos - por eyaculado.....	14
4. Morueco #2: resultados obtenidos - por eyaculado.....	15
5. Morueco #3: resultados obtenidos - por eyaculado.....	16
6. Morueco #4: resultados obtenidos - por eyaculado.....	17

I.- R E S U M E N .

Se evaluaron los efectos que provoca el congelamiento sobre la movilidad progresiva y la morfología acrosomal del espermatozoide de morueco.

Para esto se estudiaron 28 eyaculados - obtenidos de 4 moruecos de la cruce de Tabasco x Dorset (Tarsset), los que se congelaron utilizando como diluyente: Tris - Yema de huevo glicerolado al 5%.

Los resultados obtenidos indican que el congelamiento del semen provoca una disminución - altamente significativa ($P < 0.01$) en la movilidad progresiva y en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal.

El método de congelamiento desarrollado en este trabajo presenta en el semen descongelado: \bar{x} 54.41% (D.E.±6.27) de movilidad progresiva.

-va; \bar{x} 66.30% (D.E.±8.37) de recuperación de mo
vilidad y \bar{x} 60.42% (D.E.±7.14) de espermatozoi-
des con acrosoma normal.

Lo anterior indica que esta técnica ade-
más de proporcionar muy buena movilidad al descon-
gelado, confiere una aceptable protección acro-
somal.

II.- INTRODUCCION .

La capacidad del semen para sobrevivir - al congelamiento ha contribuido ampliamente a difundir la práctica de la Inseminación Artificial - en los cinco continentes.

La Inseminación Artificial con semen congelado en los ovinos se practica con resultados -- prometedores, pero su difusión se ha visto restringida por una serie de limitantes que la investigación seguramente superará a corto plazo.

El semen de ovino presenta una aceptable supervivencia espermática al descongelado (8), pero la inseminación artificial con este tipo de semen no ha dado tan buenos resultados como en el bovino debido a que los índices de fertilidad alcanzados han sido relativamente bajos (26). Gustaffson (8) señala que el índice de concepción con semen descongelado es por lo menos 20% inferior al logrado con semen fresco. En cambio, Oolas -

- obtuvo índices de concepción similares utilizando semen fresco y descongelado (3).

Entre las causas que afectan la fertilidad del semen descongelado, se encuentra el sitio de colocación del semen al inseminar. Diferentes autores (1,7,8,16,17,19,22) señalan que -- cuando se deposita en cervix el índice de concepción es bajo (12 a 48%), en cambio cuando se deposita en útero, la fertilidad llega a ser similar a aquella lograda con semen fresco (88 a 95%).

Pero el depósito intrauterino es técnicamente difícil, ya que solo puede lograrse en un 50% de las ovejas por personal especializado (8).

El bajo índice de concepción obtenido -- cuando se deposita el semen descongelado en el cervix, es causado por un transporte espermático deficiente debido a trastornos en la actividad ciliar del cervix (8,34,35), ya que cuando se diluye el semen, también se diluye la cantidad total de prostaglandinas seminales, que además son las encargadas de facilitar el paso de los espermato--

-zoides a través del moco cervical (8). La adición al semen diluido con prostaglandinas E_1 , E_2 y F_2 alfa antes del congelamiento, aumenta en 15% el total de espermatozoides que llegan al oviducto e incrementa la fertilidad en más del 15% (4).

Otra causa que afecta la fertilidad, es el daño que sufre el espermatozoide durante los procesos de dilución y congelamiento del semen (11, 32).

El objetivo del presente trabajo consiste en congelar semen de morusco y evaluar las alteraciones causadas al espermatozoide en cuanto a movilidad progresiva y morfología acrosomal.

III.- MATERIAL Y METODOS .

Se estudiaron 28 eyaculados obtenidos -- por medio de vagina artificial de 4 moruecos de la cruz de Tabasco x Dorset (Tarsset), en el Centro Nacional para la Enseñanza, Investigación y Extensión de la Zootecnia, Tepetzotlán, Estado de México a 19°44' Norte, 99°44' Oeste y 2450 m.s.n.m.; con un clima tipo C(wo)(w)b(i') según la clasificación de Köppen modificada para México (6).

A cada eyaculado en fresco se le determinó: Volúmen, pH, Movilidad en masa, Movilidad progresiva y Morfología acrosomal. Los -- tres primeros parámetros se evaluaron con el fin -- de conocer si el semen reunía las condiciones de -- calidad y cantidad necesarias para realizar un -- buen congelamiento.

Cada uno de los eyaculados se sometió al siguiente tratamiento:

1.- Dilución en proporción 1:9 con el diluyente -

de Tris preparado de acuerdo a la fórmula descrita por Simmet (28), adicionado con 20% de yema de huevo y 5% de glicerol.

2.- Centrifugación a 300 gravedades durante 15 minutos.

3.- Resuspensión del paquete de espermatozoides centrifugados, previa eliminación del sobrenadante; en proporción 1:5 con el mismo diluyente utilizado en el paso #1.

4.- Envasado del semen diluido en minipotes tipo continental de 0.25 ml.

5.- Equilibramiento: los minipotes se colocan sumergidos dentro de un recipiente de poliuretano con agua a 22°C y se introducen al congelador(0°C) durante 120 minutos, tiempo en el que el semen alcanza una temperatura de 5°C.

6.- Congelamiento de los minipotes por exposición a vapores de nitrógeno durante 10 minutos a una distancia de 4.5 cm sobre el nivel del N₂ lí-

-quido (aproximadamente -80°C). Ya congelados, se introducen directamente al nitrógeno líquido -- (-196°C) y se almacenan.

Nota: Los pasos 2, 3 y 4 se realizaron a temperatura ambiente.

Los minipopotes se descongelaron en agua a 40°C durante 40 segundos y se les repitió la determinación de la movilidad progresiva y de la morfología acrosomal.

La morfología acrosomal se determinó mediante la técnica descrita por Hancock (10), diferenciando los acrosomas normales de los anormales de acuerdo a la clasificación citada por Vázquez (31).

Los resultados fueron evaluados por medio de análisis de varianza y prueba de Wilcoxon para detectar si existen diferencias entre el semen fresco y el descongelado en cuanto a movilidad progresiva y al porcentaje de espermatozoides con

acrosoma normal.

Además para detectar si existen diferencias entre moruecos, se corrió la prueba de análisis de varianza en cada uno de los siguientes parámetros: Movilidad progresiva del semen fresco; Movilidad progresiva del semen descongelado; Recuperación de movilidad del semen post-tratamiento; Porcentaje de acrosomas normales en el semen fresco y Porcentaje de acrosomas normales en el semen descongelado.

IV.- RESULTADOS .

4.1.- Semen Fresco.

De las muestras de semen colectadas se -
obtuvieron los siguientes resultados promedio en -
fresco:

- Volúmen:	1.08	(D.E.± 0.33)	ml.
- pH:	7.07	(D.E.± 0.178).	
- Movimiento en masa:	4.84	(D.E.± 0.334).	
- Movilidad progresiva:	82.32	(D.E.± 5.13)	%.
- Acrosomas normales:	99.96	(D.E.± 0.189)	%.

Tanto en la movilidad progresiva como en
el porcentaje de espermatozoides con acrosoma nor-
mal no se encontraron diferencias significativas -
entre moruecos ($P > 0.05$).

4.2.- Semen descongelado.

-Movilidad: Debido al tratamiento se notó una
disminución en la movilidad progresiva del semen -

descongelado con respecto al semen fresco que fué altamente significativa ($P < 0.01$). La movilidad progresiva del semen descongelado promedió 54.41% (D.E. ± 6.27), encontrándose diferencias significativas entre los 4 moruecos ($P < 0.05$).

La recuperación de movilidad post-tratamiento promedió 66.30% (D.E. ± 8.37) y no se encontraron diferencias significativas entre moruecos ($P > 0.05$).

-Daño Acrosomal: Después del tratamiento se notó una disminución en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal del semen descongelado con respecto al semen fresco que fué altamente significativa ($P < 0.01$). El porcentaje de espermatozoides normales en el semen descongelado promedió 60.42% (D.E. ± 7.146) y tampoco se encontraron diferencias significativas entre los 4 moruecos ($P > 0.05$).

CUADRO # 1

PROMEDIOS, DESVIACIONES ESTANDAR Y COEFICIENTES DE VARIACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS EYACULADOS ESTUDIADOS.

	PROMEDIO TOTAL	DESVIACION ESTANDAR	COEFICIENTE DE VARIACION
VOLUMEN (ml)	1.08	± 0.330	30.55
pH	7.07	± 0.187	2.51
MOVIMIENTO EN MASA.	4.84	± 0.334	6.90
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN FRESCO (%).	82.32	± 5.134	6.23
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN FRESCO (%).	99.96	± 0.189	0.18
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	54.41	± 6.277	11.53
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	60.42	± 7.146	11.82
RECUPERACION DE MOVILIDAD (%).	66.30	± 8.370	12.62

MORUECO No.	1	2	3	4
VOLUMEN (ml)	1.27	1.14	1.10	0.82
pH	7	7	7.14	7.14
MOVIMIENTO EN MASA.	4.78	4.85	4.78	4.92
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN FRESCO (%).	82.14	81.42	84.28	81.42
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN FRESCO (%).	100	100	99.85	100
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	51.09	51.31	59.71	55.54
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	59.28	59.85	60.85	61.71
RECUPERACION DE MOVILIDAD (%).	62.36	63.19	71.11	68.56

PROMEDIOS PARCIALES DE LOS 4 MORUECOS.

CUADRO # 2

MUESTRA No.	1	2	3	4	5	6	7
VOLUMEN (ml)	0.9	1.2	1.5	1.1	1.5	1.5	1.2
pH	7	7	7	7	7	7	7
MOVIMIENTO EN MASA.	4	4.5	5	5	5	5	5
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN FRESCO (%)	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	90.0	85.0
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN FRESCO (%)	100	100	100	100	100	100	100
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	40	47	53.3	56.38	60.66	47.5	52.82
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	49	55	55	54	70	67	65
RECUPERACION DE MOVILIDAD (%)	50	58.75	66.62	70.47	75.82	52.77	62.14

MORUECO No. 1: resultados obtenidos por eyaculado.

CUADRO # 3

MUESTRA No.	1	2	3	4	5	6	7
VOLUMEN (ml)	1.2	1.0	2.0	1.0	0.8	0.8	1.2
pH	7	7	7	7	7	7	7
MOVIMIENTO EN MASA.	4	5	5	5	5	5	5
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN FRESCO (%).	75.0	80.0	75.0	85.0	85.0	85.0	85.0
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN FRESCO (%).	100	100	100	100	100	100	100
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	45	53.2	56	44.06	50	54.7	56.25
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	53	45	53	70	74	62	62
RECUPERACION DE MOVILIDAD (%).	60	66.5	74.66	51.83	58.82	64.35	66.17

MORUECO No. 2: Resultados obtenidos por eyaculado.

CUADRO # 4

MUESTRA No.	1	2	3	4	5	6	7
VOLUMEN (ml)	1.5	1.2	1.2	1.0	1.2	0.8	0.8
pH	7	7	7.5	7.5	7	7	7
MOVIMIENTO EN MASA.	5	5	4.5	4	5	5	5
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN FRESCO (%).	90.0	90.0	80.0	75.0	85.0	80.0	90.0
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN FRESCO (%).	99	100	100	100	100	100	100
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	70.5	59.2	57.7	61.8	60.88	55	52.95
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	52	53	59	64	69	62	67
RECUPERACION DE MOVILIDAD (%).	78.33	65.77	72.12	82.4	71.62	68.75	58.83

MORUECO No. 3: resultados obtenidos por eyaculado.

CUADRO # 5

MUESTRA No.	1	2	3	4	5	6	7
VOLUMEN (ml)	0.8	1.3	0.4	0.8	0.9	0.8	0.8
pH	7	7.5	7.5	7	7	7	7
MOVIMIENTO EN MASA.	4.5	5	5	5	5	5	5
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN FRESCO (%).	75.0	75.0	80.0	90.0	85.0	77.5	87.5
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN FRESCO (%).	100	100	100	100	100	100	100
MOVILIDAD PROGRESIVA EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	60.7	50.1	57.85	57.6	55	56.17	51.4
ACROSOMAS NORMALES EN EL SEMEN DESCONGELADO (%)	56	59	63	60	66	67	61
RECUPERACION DE MOVILIDAD (%).	80.93	66.8	72.31	64	64.7	72.47	58.74

MORUECO No. 4: resultados obtenidos por eyaculado.

CUADRO # 6

V.- D I S C U S I O N .

Las características del semen estudiado en fresco concuerdan con las publicadas por Hafez (9), que señala las siguientes constantes para semen de morueco: Volúmen, 0.8 - 1.2 ml; -- pH, 5.9 - 7.3; Movilidad progresiva, 60 - 80% y Acrosomas normales, 80 - 95%.

Como promedio de la movilidad progresiva en semen fresco se obtuvo 82.32% (D.E.±5.13), mismo que debido al tratamiento bajó a 54.71% (D.E.±6.27) en el semen descongelado. En lo que se refiere al promedio de espermatozoides con acrosoma normal en semen fresco se obtuvo 99.96% (D.E.±0.189) y también mostró un descenso posterior al tratamiento, siendo éste parámetro de 60.42% (D.E.±7.146) en el semen descongelado.

En ambos parámetros la disminución fué altamente significativa ($P < 0.01$).

La movilidad progresiva al descongelado obtenida en el presente trabajo supera a las publicadas por diferentes autores (2,3,12,29,30), - que reportan movilidades al descongelado que varían de 30 a 45%. La recuperación de movilidad en el semen descongelado promedió 66.30% -- (D.E.±8.37), porcentaje que refleja fielmente - el número de células vivas que recobran su movilidad después del tratamiento.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal al descongelado, el resultado obtenido coincide con los reportados por: Tasseron et al, 1977; Bustamante, 1980; y supera a los reportados por otros autores (12,32).

Los mencionados descensos post-trata- - miento en la movilidad progresiva y en el total de células con acrosoma normal, se deben a cambios físicos y químicos provocados en la célula durante los procesos de dilución, lavado, congelamien- to y descongelamiento.

La diluición y el lavado ocasionan las siguientes alteraciones en el espermatozoide:

Hinchamiento y degeneración del complejo lipoproteico, oxidación de grupos sulfhidrilos intracelulares, disminución en el contenido de coenzimas vitales, incremento en la permeabilidad espermática y pérdida de proteínas intracelulares -

(21). Mientras que el congelamiento y descongelamiento provocan las siguientes: Remoción y alteración de componentes celulares, trastornos en el intercambio iónico (21); pérdida de integridad de las membranas celulares, inactivación de enzimas acrosomales (15,25,33); pérdida de fosfolípidos (13,14,20); cristalización (5,23,27); cambios en el pH del medio extracelular, deshidratación, concentración de solutos, electrolitos y de sustancias o gases tóxicos en el interior de la célula (18,24).

VI.- C O N C L U S I O N E S .

1. El congelamiento posee una marcada acción de--
presora de la movilidad progresiva, y aumen-
ta significativamente el porcentaje de esperma-
tozoides con alteraciones acrosomales en el se-
men descongelado.
2. El método de congelamiento utilizado en el pre-
sente estudio, ofrece una recuperación de mo-
vilidad superior a las reportadas y confiere -
una buena protección al acrosoma.
3. Tanto en el semen fresco como en el descongela-
do, no se encontraron diferencias significa-
tivas entre moruecos en los parámetros estudia-
dos, con excepción del de la movilidad pro--
gresiva al descongelado, diferencias para -
las cuales no se encontró explicación, por -
lo que sería conveniente realizar investigacio-
nes al respecto.

VII.- B I B L I O G R A F I A .

1. ANDERSON V.K., AAMDEL J. & FUGNER J.A.: In--trauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. Zuchthygiene 8:113 -- (1973).
2. BUSTAMANTE C.G.: Acción del sulfóxido de dime--tilo y glicerol como agentes crioprotectores - del acrosoma del espermatozoide de carnero du--rante la congelación. Vet.Mex. 12:211-216 -- (1980).
3. COLAS G.: Effect of initial freezing tempera--ture, adition of glicerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-fro--zen ram semen. J.Reprod.Fert. 42:277-285 (1975).
4. DIMOV V. & GEORGIEV G.: Ram semen prostaglan--din concentration and its effects on fertility J.Anim.Sci. 44:1050 (1977).

5. FARRANT J., WALTER C.A., HEATHER L. & MCGANN -
L.F.: Use of two-step cooling procedures to -
examine factors influencing cell survival ---
following freezing and thawing. Cryobiol. 14:
273-286 (1977).

6. GARCIA E.: Modificaciones al sistema de clasifi-
cación climática de Köppen. Inst. de Geogra-
-fa. U.N.A.M., 1973.

7. GRAHAM E.F., CRABO B.G. & PACE M.M.: Current
status of semen preservation in the ram, boar,
and stallion. J.Anim.Sci. 47 (Supplement II):
80 - 119 (1978).

8. GUSTAFSSON B.K.: Aspects of fertility with --
frozen-thawed ram semen. Cryobiol. 15:358-361
(1978).

9. HAFEZ E.S.E.: Reproduction in farm animals. -
3rd ed. Lea & Febiger. Phil. U.S.A., 1974.

10. HANCOCK J.L.: The spermatozoa of sterile --
bulls. J.Expl.Biol. 30:50 (1953).
11. HEALFY P.: Effect of freezing on the ultraes-
tructure of spermatozoa of some domestical ani-
mals. J.Reprod,Fert. 18:21-27 (1969).
12. JONES R.: The use of dimethyl sulfoxide, gli-
cerol and reconstituted skim milk for the pre-
servation of ram spermatozoa. Aust.J.Biol.Sci.
18:887-900 (1965)
13. JONES R. & MANN T.: Lipid peroxidation in --
spermatozoa. Proc.R.Soc.B. 184:103-107 --
(1973).
14. JONES R. & MANN T.: Lipid peroxides in sperma-
tozoa, formation, role of plasmalogen and phy-
siological significance. Proc.R.Soc.B. 193:
317-333 (1976).
15. JONES R. & MANN T.: Damage to ram spermatozoa
by peroxidation of endogenous phospholipids. -
J.Reprod,Fert. 50:261-268 (1977).

16. LIGHTFOOT R.J. & SALAMON S.: Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. -- I. Transport and availability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. J.Reprod. Fert. 22:385 (1970).
17. LIGHTFOOT R.J. & SALAMON S.: Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. -- II. The effects of method of insemination on fertilization and embryonic mortality. J.Reprod.Fert. 22:399 (1970).
18. LOCKSLEY E.M.: Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiol. 15:382-390 (1978).
19. LOGINOVA N.V. & ZELTOBRJUH N.A.: Evaluación de varios métodos de congelamiento de semen (en ruso). Ovtsevodstvo 14:22 (1968).
20. LOVELOCK J.E. & BISHOP M.W.H.: Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. Nature. 183:1394 (1959)

21. MANN T.: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Mathewen & Co.Ltd. - 1964.

22. MATTNER P.E., ENTWISTLE K.W. & MARTIN I.O.A.: Passage, survival and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. - Aust.J.Biol.Sci. 22:181 (1969).

23. MAZUR P., LEIBO S.P. & CHU E.H.Y.: A two-factor hypothesis of freezing injury. Exp.Cell.-Res. 71:345 (1972).

24. MERYMAN H.T.: Cryobiology. Academic Press. - London & New York., 1966.

25. ROUBAL W.T. & TAPPEL A.L.: Damage to proteins, enzymes and aminoacids by peroxidizing lipids. Archs.Biochem.Biophys. 113:5-8 (1966).

26. SALAMON S. & VISSER D.: Recent advances in -- the deep-freezing of ram semen. S.Afr.J.Sci. 4:275-288 (1974).

27. SHERMAN J.K. & LIU K.C.: Relation of ice to - ultrastructural cryoinjury and cryiprotection of rough endoplasmic reticulum. Cryobiol. -- 13:599-608 (1976).

28. SIMMET L.: Konfektionierung von Bullensperma in Kunststoffröhrchen nach der Landshuter Methode. Tierärztl.Umschau. 2:88-90 (1972).

29. SNEDEKER W.H. & GAUNYA W.S.: Dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for freezing - bovine semen. J.Anim.Soi. 30:953-956 (1970).

30. TASSERON F., AMIR D. & SHINDLER H.: Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. J.Reprod.Fert. 51:461-462 (1977).

31. VAZQUEZ R.F.: Aktivitätsbestimmung des akrosomales Enzymes Akrosin und deren Brauchbarkeit in der spermatologischen Diagnostik im Rahmen der-Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma. Hannover Tierärztl Hochschule, Diss., -- 1978.

32. WATSON P.F. & MARTIN I.C.A.; A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram - and bull spermatozoa. J.Reprod.Fert. 28:99-101. (1972).

33. WILLIS E.D.; Effect of unsaturated fatty acids and their peroxides on enzymes. Biochem. Pharmacol. 7:7-16 (1961).

34. WORDINGER R.J., RAMSEY J.B., DICKEY J.F. & HILL J.R.Jr.; On the presence of a ciliated columnar epithelial cell type within the bovine cervical mucosa. J.Anim.Sci. 36:936-940 (1973).

35. WU A.S.H. & STORMSHAK F.; Ultrastructure of ovine cervical epithelium. J.Anim.Sci. 43: - 311. (1976).