

01669
Tes.
1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia

División de Estudios de
Postgrado



**ACCION DEL SULFOXIDO DE DIMETILO Y GLICEROL
COMO AGENTES CRIOPROTECTORES DEL ACROSOMA
DEL ESPERMATOZOIDE DE CARNERO DURANTE LA
CONGELACION.**

T E S I S

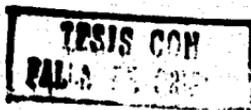
PRESENTADA PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE:

Maestro en Producción Animal

POR:

GERARDO BUSTAMANTE CUIEL

1980





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 está 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.

ACCION DEL SULFOXIDO DE DIMETILO Y GLICEROL COMO AGENTES CRIOPROTECTORES DEL ACROSOMA DEL ESPERMATOZOIDE DE CARNERO DURANTE LA CONGELACION.

Tesis presentada ante la

División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la

Universidad Nacional Autónoma de México

para la obtención del grado de

Maestro en Producción Animal

por

Gerardo Bustamante Curiel

Abril de 1980

APROBADA POR

DR. JAVIER DE J. VALENCIA M.
ASESOR PRINCIPAL.

DR. SAUL FERNANDEZ BACA

DR. HEDBERTO RUIZ S.

DR. PEDRO OCHOA GALVAN.

LISTA DE CONTENIDO

		<u>Página</u>
I	INTRUDUCCION.....	1
II	REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1	Diluyentes.....	3
2.2	Daños por Congelación.....	4
2.3	Crioprotectores.....	5
2.4	Recuperación de Movilidad.....	6
2.5	Daño Celular.....	7
2.6	Indice de Concepción.....	9
III	MATERIAL Y METODOS.....	13
3.1	Localización del Experimento.....	13
3.2	Semen.....	13
3.3	Tratamientos.....	16
3.4	Dilución y Congelación.....	17
3.5	Descongelado.....	19
3.6	Evaluación de Tratamientos.....	19
3.7	Análisis Estadístico.....	19
IV	RESULTADOS.....	21
4.1	Movilidad	21
4.2	Daño Acrosomal.....	22
4.3	Correlaciones.....	23
V	DISCUSION.....	30
VI	CONCLUSIONES.....	35

		<u>Página</u>
VII	APENDICES.....	37
VII	LITERATURA CITADA.....	42

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>		<u>Página</u>
1	Recuperación de movilidad espermática de semen ovino al descongelado, utilizando como crioprotectores el Glicerol y DMSO.	10
2	Espermatozoides normales en semen ovino congelado utilizando Glicerol y DMSO como crioprotectores.	11
3	Indices de concepción logrados con semen ovino congelado con diferentes diluyentes y Glicerol.	12
4	Movilidad espermática (%) de semen diluido en yema de huevo-tris con diferentes crioprotectores (media \pm D.E.).	24
5	Análisis de varianza para el factor movilidad	25
6	Porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal en semen diluido en yema de huevo	

CuadroPágina

	vo-tris con diferentes crio-protectores (media \pm D.E.).	26
7	Análisis de varianza para espermatozoides con acrosoma normal.	27
8	Coefficiente de correlación - entre espermatozoides normales y movilidad en las diferentes etapas del tratamiento I (n=16).	38
9	Coefficiente de correlación - entre espermatozoides normales y movilidad en las diferentes etapas del tratamiento II (n=16).	39
10	Coefficiente de correlación - entre espermatozoides normales y movilidad en las diferentes etapas del tratamiento III (n=16).	40
11	Coefficiente de correlación - entre espermatozoides normales y movilidad en las dife-	

Cuadro

Página

rentes etapas del tratamien-
to IV (n=16).

41

LISTA DE GRAFICAS

<u>Gráfica</u>		<u>Página</u>
1	Espermatozoides con acrosoma normal y movilidad al descongelado.	28
2	Correlación y Regresión entre espermatozoides con acrosoma normal en semen descongelado y movilidad progresiva del semen fresco (semen - tratado con Glicerol).	29

RESUMEN

BUSTAMANTE CURIEL, GERARDO. Acción del Sulfóxido de Dimetilo y Glicerol como Agentes Crioprotectores del Acrosoma del Espermatozoide de Carnero durante la Congelación. (Bajo la dirección de Javier Valencia Méndez).

Se evaluó la capacidad del Sulfóxido de dimetilo (DMSO) y Glicerol para proteger al espermatozoide de carnero durante la congelación.

Se congeló semen de cuatro carneros utilizando diluyente yema de huevo-tris. El semen fué sometido a cuatro tratamientos experimentales. Estos grupos fueron: I Testigo (sin crioprotector), II con DMSO (6%), III con Glicerol (5%) y IV con Glicerol-DMSO (7.0 y -- 1.5 % respectivamente). La evaluación de los tratamientos se hizo midiendo los siguientes parámetros: Movilidad progresiva y Espermatozoides con acrosoma normal. Estos parámetros se midieron en el semen fresco, diluido y enfriado y en semen descongelado.

Se encontró que el diluyente yema de huevo-tris es suficiente para proteger la integridad acrosomal mas no la movilidad espermática durante la congelación. El glicerol resultó ser el mejor crioprotector -- siguiendole la combinación de Glicero-DMSO y por último el DMSO solo.

Se encontró una alta correlación entre la mo
vilidad espermática del semen fresco y el número de es
permatozoides con acrosoma normal cuando se congeló el
semen con el diluyente yema de huevo-tris y glicerol.

I INTRODUCCION

México es un país con vastas zonas propias para la explotación del ovino. Sin embargo, la población ovina nacional ha sufrido en los últimos años una disminución del 1.1% anual (25). Esta situación y el crecimiento demográfico de México del 3.5% anual (38), hacen necesaria la importación de carne y lana, con salida de divisas que provocan un desequilibrio en la balanza comercial.

Por lo mencionado anteriormente, se hace indispensable el mejoramiento de los sistemas de explotación así como la calidad genética de esta especie (35). La Inseminación Artificial (I.A.) con semen fresco y posteriormente con semen congelado ha logrado el mejoramiento genético de varias especies, particularmente de los bovinos.

La I.A. con semen congelado en los ovinos no ha dado resultados tan satisfactorios como en el caso del bovino, ya que los índices de fertilidad alcanzados hasta la fecha han sido relativamente bajos (29).

Con la utilización de semen congelado para la I.A. de los ovinos, el mejoramiento genético de esta especie se vería acelerado, y el gasto sería inferior al necesario en la actualidad para la adquisición de semen-

tales de gran valor genético, además facilitaría el desarrollo de programas gubernamentales tendientes a beneficiar esta especie, principalmente en las regiones tropicales a las que se les está dando un gran impulso.

Entre las posibles causas de los pobres resultados obtenidos con semen congelado, se señala el daño acrosomal por dilución y congelación del semen (11,37) ocasionado por falta de protección de los diluyentes ordinarios a la célula espermática (34). Para evitar estos daños, se han utilizado diferentes crioprotectores, los que adicionados al diluyente impiden que el espermatozoide se vea afectado por el congelamiento. Entre estos compuestos se encuentra el sulfóxido de dimetilo (DMSO), el glicerol, propilenglicol, polivinil pirrolidona (PVP), -hidroxietil almidón (HES), siendo los dos primeros los más comunmente utilizados en la conservación de espermatozoides a temperaturas subcero.

El propósito de este trabajo fué el de evaluar el Sulfóxido de dimetilo y el Glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide del carnero así como su efecto sobre la recuperación espermática al descongelado. Esto, como una contribución en la búsqueda de una técnica que mejore los resultados de la I.A. en el ovino y que mediante su aplicación práctica, ayude a acelerar el mejoramiento genético de esta especie.

II REVISION DE LITERATURA

2.1- Diluyentes:

En la I.A se han utilizado diversos tipos de diluyentes, con el propósito de aumentar el volumen del eyaculado para un mejor aprovechamiento del mismo, así como el de proveer al espermatozoide de un medio que llene sus requerimientos fisiológicos y le permita sobrevivir y conservar su capacidad fecundadora. Los diluyentes más comunmente utilizados son: la gelatina, yema de huevo, leche, frutas y vegetales (20).

Los diluyentes empleados para la congelación de semen de carnero han sido a base de yema de huevo y leche (homogeneizada o descremada) obteniendose resultados similares en cuanto a recuperación de movilidad y fertilidad, por lo que es posible emplearlos indistintamente (2,8). La leche para su uso como diluyente deberá calentarse a 85-100°C durante 10 minutos para eliminar macromoléculas tóxicas para el espermatozoide (10,12, 33).

El diluyente INRA* glicerclado al 4% ha -

* INRA: Patente número 73-45351, A.N.V.A.R., A. 13, rue Madeleine Michelis, 92200 Neully-sur-Seine, France; patente pendiente.

probado ser el mejor para congelar semen de carnero hasta el momento actual, ya que Colas (4) después de almacenar semen a -196°C por un periodo de dos meses e inseminar ovejas con estro sincronizado, obtuvo igual índice de concepción al obtenido por inseminación con semen --- fresco.

2.2- Daños por Congelación:

Los espermatozoides al ser congelados pueden sufrir la pérdida de la integridad de las membranas celulares e inactivación hasta un 20% de enzimas acrosomales (15,28,39) y pérdida de fosfolípidos (13,14,19). - Estos daños se deben a que durante la congelación hay salida de agua intracelular hacia el medio que suspende a las células para la formación de hielo. Esto trae como consecuencia deshidratación y la consiguiente concentración gradual de solutos, electrolitos y de sustancias o gases tóxicos en el interior de la célula y cambios en el pH del medio extracelular (18,23).

Existe considerable evidencia de que el daño celular durante la congelación y descongelado se debe a la cantidad de hielo formado intracelularmente (7, 22,31). Diferentes métodos de congelación de células in-

volucran la utilización de técnicas diseñadas para evitar o minimizar la congelación intracelular. Durante el proceso de enfriamiento lento en donde el hielo está restringido al medio extracelular, el agua es removida osmóticamente y se impide la congelación intracelular. Sin embargo, las células pueden ser dañadas por un ambiente de solutos concentrados durante el enfriamiento (22), -- por lo que es necesario enfriar lo suficientemente lento para evitar la congelación intracelular y lo suficientemente rápido para minimizar el daño debido a los cambios del medio extracelular (18).

2.3- Crioprotectores:

Muchas células tienen alta recuperación -- solo si un crioprotector está presente en el medio que -- la suspende durante el enfriamiento. Estos compuestos se han clasificado en a) Penetrantes como el Glicerol y el DMSO (26,27,30,33) y b) No penetrantes como el PVP y HES (18,24). La protección de estos compuestos se basa en la restricción de la congelación intracelular y minimización del daño celular debido a los solutos concentrados -- en el medio durante el enfriamiento. Esto se debe a la -- acción coligativa de los compuestos, tanto penetrantes --

como no penetrantes, reduciendo la cantidad de agua intracelular. Esto se lleva a cabo en forma diferente por estos compuestos. Los agentes penetrantes crean el ambiente adecuado para la reducción del contenido de agua de la célula a temperaturas suficientemente bajas para reducir el efecto nocivo de los solutos concentrados en la célula. Los agentes no penetrantes retiran agua de la célula por cambios osmóticos durante la fase inicial de congelación a temperaturas entre -10 y -20°C (18).

2.4- Recuperación de Movilidad:

Se ha observado en el toro que una alta movilidad es más importante que la alta densidad espermática para la concepción cuando no hay daño acrosomal (17). En células con daño acrosomal no necesariamente se encuentra afectada la movilidad, pero si su fertilidad (11). Se ha encontrado que el 68% del daño acrosómico está distribuido al azar entre la población de células móviles e inmóviles (11). Debido a esto, la evaluación de movilidad, no da una imagen confiable de la fertilidad del semen; sin embargo, esta prueba ha sido empleada comunmente para evaluar los resultados de la congelación de semen. (6,12,33,34).

La recuperación de movilidad al descongelado utilizando como crioprotectores el sulfóxido de dimetilo (DMSO) y el glicerol se presenta en el Cuadro 1.- Se puede observar que Colas (4) al congelar semen de carnero obtuvo una recuperación de movilidad similar a la obtenida por otros autores (12,33,34). Mediante el empleo de DMSO como crioprotector, Snedeker y Gaunya (33) obtuvieron movilidad más baja que la lograda con glicerol, pero la combinación glicerol-DMSO dió un resultado satisfactorio. Jones (12) por otro lado obtuvo solo un 4.3% de recuperación de movilidad con DMSO solo, pero al adicionar este compuesto al diluyente glicerolado obtuvo -- 45% de recuperación celular que representa un incremento de 7.5% de la obtenida con glicerol solo. Los trabajos citados (12,33) concuerdan en que el DMSO es más tóxico que el glicerol solo para el espermatozoide. También indican que la recuperación de la movilidad no solo depende del crioprotector utilizado sino también de su concentración.

2.5- Daño Celular:

Se han realizado diferentes trabajos para determinar el daño celular (Cuadro 2). Tasseron et al.--

(34) investigaron el daño acrosomal ocasionado por el -- proceso de congelación. Mediante el empleo de microscopio electrónico se determinó mayor cantidad de daño celular que el observado por microscopía de luz, ya que pudieron detectar con mayor precisión pequeños hinchamientos del acrosoma.

Jones (12) al congelar semen de carnero, -- encontró que el daño celular en espermatozoides congelados con glicerol, fué menor ($P < 0.05$) que el producido -- con DMSO, pero no fué diferente ($P > 0.05$) al encontrado -- cuando se empleó la combinación de estos compuestos; de esto se deduce que el DMSO solo confiere cierta protección a la célula durante la congelación, aunque en menor grado que el glicerol. Este autor determinó el daño celular mediante la tinción rojo congo-nigrosina, ya que la membrana del espermatozoide dañado permite la entrada -- del colorante.

Watson y Martin (37) observaron que el acrosoma del espermatozoide de carnero es más susceptible al daño por congelación que el de bovino durante este -- proceso. Es necesario señalar que este autor encontró menos espermatozoides normales que los observados por otros investigadores (12,34) posiblemente debido a alguna falla en el método de congelación.

2.6- Índice de Concepción:

Esta es la prueba más precisa para determinar la capacidad fecundante del semen. Sin embargo, su evaluación requiere tiempo para hacer el diagnóstico de gestación y observar los resultados.

Este método ha sido empleado por varios autores para evaluar los resultados de la congelación. Según Salamon y Visser (29) la I.A. no ha dado resultados tan satisfactorios como en los bovinos, ya que los índices de fertilidad alcanzados con semen congelado han sido muy bajos, por lo que esta técnica es impráctica en explotaciones comerciales. En trabajos más recientes -- (Cuadro 3), Colas (4) obtuvo índices de concepción similares al utilizar semen fresco y congelado con glicerol; sin embargo Tasseron et al. (34) como resultado colateral de su trabajo, obtuvieron un índice de concepción -- mucho más bajo, atribuyendo sus pobres resultados al bajo número de espermatozoides utilizados para la I.A. --- (80×10^6 espermatozoides móviles) y el lugar de su aplicación, mas que a la técnica empleada para congelar.

CUADRO N°1

Recuperación de movilidad espermática de semen ovino al descongelado, utilizando como crioprotectores el glicerol y DMSO.

AUTOR	AÑO	DILUYENTE USADO	CRIOPROTECTOR	MOVILIDAD (%)
Colas (4)	1975	Yema de huevo lacto sa	Glicerol (4%)	33.9
		INRA	Glicerol (4%)	37.0
Snedeker y Gaunya (33)	1970	Leche homogeneizada	Glicerol (7.5%)	36.0
			DMSO (6%)	24.0
			Glicerol (2.5%) + DMSO (4%)	34.0
Tasseron <u>et al.</u> (34)	1977	Rafinosa-citrato de sodio-yema de huevo	Glicerol (5%)	30.0
Jones (12)	1965	Leche descremada	Glicerol (5%)	37.5
			DMSO (6%)	4.3
			Glicerol (7%) + DMSO (1.55)	45.0

CUADRO N°2

Espermatozoides normales en semen ovino congelado utilizando Glicerol y DMSO como crioprotectores.

AUTOR	ESPECIE	DILUYENTE USADO	CRIOPROTECTOR	ESPERMATOZOIDES NORMALES (%).
Tasseron <u>et al.</u> (34)	ovina	Rafinosa-citrato de sodio-yema de huevo	Glicerol (5%)	(1) 92.0 A
				(2) 66.4 A
				(3) 60.2 A
Jones (12)	ovina	Leche descremada-fructosa	a) Glicerol (5%) b) DMSO (6%) c) Glicerol (7%)+ DMSO (1.5%)	49.0
				32.8
				38.8
Watson y Martin (37)	ovina	Fructosa, glucosa, NaCl, Na ₂ HPO ₄ , KCl, NaH ₂ PO ₄ - yema de huevo.	Glicerol (7.5%)	11.3
	bovina	Fructosa, glucosa, NaCl, Na ₂ HPO ₄ , KCl, NaH ₂ PO ₄ - yema de huevo.	Glicerol (7.5%)	28.7

A= Observación por microscopía de luz

B= Observación por microscopía electrónica

a vs b (P<0.01); a vs c N.S.

(1) Semen fresco

(2) Semen diluido y enfriado

(3) Semen descongelado

CUADRO N°3

Indices de concepción logrados con semen ovino congelado con diferentes diluyentes y Glicerol.

AUTOR	AÑO	DILUYENTE USADO	CRIOPROTECTOR	DOSIS I.A.	CONCEPCION (%)
Colas (4)	1975	INRA	Glicerol (4%)	180x10 ⁶ móviles	68.3
		Leche descremada	"fresco"	180x10 ⁶ móviles	71.3
		Yema de huevo-lacto sa.	Glicerol (4%)	180x10 ⁶ móviles	42.2
Tasseron <u>et al.</u> (34)	1977	Rafinosa-citrato de sodio-yema de huevo	Glicerol (5%)	240x10 ⁶ totales (1)	20.6

(1) Inseminación vaginal

III MATERIAL Y METODOS

3.1- Localización del Experimento:

El trabajo fué realizado en el Centro Nacional para la Enseñanza, Investigación y Extensión de la Zootecnia (Rancho 4 Milpas) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en el Municipio de Tepotzotlán, Estado de México a 19° 44' de latitud Norte y 99° 44' de longitud Oeste; su altitud es de 2310 mts. sobre el nivel del mar. El clima de esta región, según Köppen, modificado para México (5) corresponde al grupo templado húmedo, con una temperatura en el mes más frío que varía de 3 a 18°C y en el mes más caliente de 6.5 a 22°C; y al subgrupo de climas templados con lluvias en el verano.

3.2- Semen:

Se utilizó el semen de tres carneros cruce de Tabasco X Dorset (Tarsset) y de un carnero Tabasco.

El semen fué colectado por el método de vagina artificial, siendo esta similar a la utilizada en

bovinos pero con diferentes dimensiones (20 cms. de largo por 5.5 cms. de diámetro). La temperatura de la vagina al momento de efectuar la colección del semen fué de 42-45°C. Inmediatamente después de la colección se determinó el volumen, pH, concentración y la movilidad en masa e individual del eyaculado.

El volumen se cuantificó en el mismo tubo graduado que se utilizó para la colección del semen; la concentración espermática fué determinada mediante el uso de una cámara de Spencer haciendo la dilución 1:200; la movilidad en masa fué determinada por observación microscópica de una gota de semen colocada en un portaobjetos a una temperatura de 40°C, calificandose de acuerdo a la escala propuesta por Kendrick (16).

- Grado 0 : Movimiento nulo.
- Grado I : Movimiento estacionario o rotatorio - débil (10-30% de células móviles)
- Grado II : Movimiento oscilatorio o rotatorio -- sin olas ni remolinos (30-50% de células móviles).
- Grado III : Movimiento progresivo rápido pocas olas y remolinos (50-80% de células móviles).
- Grado IV : Movimiento progresivo rápido con formación rápida de olas (80-90% de células móviles).

las móviles).

Grado V : Movimiento sumamente vigoroso y olas extremadamente rápidas (90-100% de células).

La movilidad progresiva se determinó por la observación microscópica de una pequeña gota de semen colocada entre porta y cubreobjetos a una temperatura de 40°C, calificándose en una escala porcentual; solamente se utilizó semen con movilidad en masa igual o mayor de IV.

El pH fué medido mediante el empleo de papel indicador.

Para determinar el daño acrosomal se siguió la técnica descrita por Hancock (9), se tomó una muestra de semen (0.01 ml) que se diluyó en 3.0 ml de solución de Hancock; una pequeña gota de esta solución se colocó entre porta y cubreobjeto, observándose 100 células en microscopio de contraste de fase con el objetivo de inmersión (100X). Se diferenciaron los espermatozoides con margen apical acrosomal normal de aquellos que presentaron alguna alteración en el acrosoma, de acuerdo con lo descrito por Vazquez (36).

3.3- Tratamientos:

Cada una de las muestras fué sometida a cada uno de los siguientes tratamientos para su congelación.

- I Diluyente yema de huevo-tris.
- II Diluyente yema de huevo-tris + 6% de DMSO.
- III Diluyente yema de huevo-tris + 5% de Glicerol.
- IV Diluyente yema de huevo-tris + 1.5% de DMSO y
7.0% de Glicerol.

La concentración de crioprotectores utilizada en cada tratamiento se determinó con base en los mejores resultados obtenidos en investigaciones de diversos autores (12,34).

Con el propósito de minimizar el efecto de carnero, se utilizó el siguiente diseño para asignar las muestras de semen de cada carnero a los diferentes tratamientos.

Tratamiento

I	1	2	3	4
II	2	3	4	1
III	3	4	1	2
IV	4	1	2	3

Se completó un total de cuatro repeticiones por animal dentro de cada uno de los tratamientos.

3.4- Dilución y Congelación:

El diluyente consistió en una solución de tris, fructosa, ácido cítrico y yema de huevo; de acuerdo a la fórmula descrita por Simmet (32).

Solución Madre

Tris (hidroximetil) amino metano	36.05 gr.
Acido cítrico	20.24 gr.
Fructosa	14.88 gr.
Agua bidestilada	Ad. 1000 ml

Con base en esta solución madre se prepararon las fracciones A y B del diluyente, en las siguientes proporciones.

Diluyente A

Solución madre	67.2 vol.
Agua bidestilada	12.8 vol.
Yema de huevo	20.0 vol.

Diluyente B	
Solución madre	67.2 vol.
Crioprotector	Según concentración deseada
Yema de huevo	20.0 vol.

Osmolaridad final: 320 miliosmoles y pH 6.75

La dilución y congelación de las muestras se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Colas -- (4) que consiste en lo siguiente: en base a la determinación del número de espermatozoides presentes en el eyaculado se calculó el diluyente necesario para lograr una concentración final de 1×10^9 espermatozoides/ml, del total de diluyente necesario, 50% correspondía al diluyente A y el restante al diluyente B.

Como primer paso se mezcló el diluyente A con el semen a una temperatura de 28°C y se enfrió a 4°C en un lapso de 2 hrs., posteriormente se agregó la cantidad calculada del diluyente B (4°C) en dos partes, con una diferencia de 20 minutos entre una y otra. Después de 150 minutos de la adición de la segunda fracción de diluyente B, se empacó en pajillas tipo continental (3) de 0.25 ml y se colocó en vapor de nitrógeno a una temperatura de -75°C durante un periodo de 8 minutos, posteriormente se sumergió en el N-líquido.

3.5- Descongelado:

El descongelado de las pajillas se realizó sumergiéndolas en agua caliente a 40°C durante 40 minutos.

3.6- Evaluación de Tratamientos:

Para evaluar los tratamientos se utilizaron los siguientes parámetros: a) movilidad progresiva - b) daño acrosomal. Ambas características se determinaron en el semen fresco (antes de la dilución), en el semen diluido y enfriado (previo a la congelación) y en el semen descongelado.

3.7- Análisis Estadístico:

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico "SAS 76.5" (1) de acuerdo al siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + E_j + T_k + C \times T_{ik} + C \times E_{ij} + E \times T_{jk} + C \times T \times E_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

en donde:

- Y_{ijkl} = Movilidad, espermatozoides normales.
 μ = Media poblacional.
 C_i = Efecto del "i-ésimo" carnero, $i=1,2,3,4$.
 E_j = Efecto del "j-ésima" etapa, $j=1,2,3$.
 T_k = Efecto del "k-ésimo" tratamiento, $k=1,2,3,4$.
 $C \times E_{ij}$ = Efecto de la interacción de carnero por etapa.
 $C \times T_{ik}$ = Efecto de la interacción de carnero por tratamiento.
 $T \times E_{jk}$ = Efecto de la interacción del tratamiento por etapa.
 $C \times T \times E_{ijk}$ = Efecto de la interacción de carnero por tratamiento por etapa.
 ϵ_{ijkl} = Error aleatorio, asumiendo que es independiente para cada observación y normalmente distribuido (0, 2).

Todos los factores incluidos en este modelo se consideran fijos.

También se realizó la prueba de Rangos - Múltiples de Duncan a un nivel de probabilidad del 95% para determinar diferencias entre las medias de los tratamientos y las etapas.

Se asume que no existe correlación entre el efecto de un tratamiento sobre el semen de un mismo carnero en las diferentes repeticiones y por lo tanto no se disminuye la variabilidad dentro de los tratamientos.

IV RESULTADOS

4.1- Movilidad:

Los resultados obtenidos en lo que respecta a la movilidad espermática obtenida antes y después - del congelamiento con diferentes crioprotectores se muestran en el Cuadro 4. La movilidad espermática observada en el semen antes de diluir (fresco) se comparó por etapas y no fué significativamente diferente ($P > 0.05$) en -- los distintos tratamientos. Al hacer la dilución y el enfriamiento del semen, se notó una disminución de la movilidad, la cual fué altamente significativa ($P < 0.01$) en -- los cuatro tratamientos. Por medio de la prueba de Duncan se determinó que dicha disminución fué igual ($P < 0.05$) para todos los tratamientos.

La movilidad espermática al descongelado -- fué significativamente inferior ($P < 0.05$) que la observada en el semen diluido y enfriado. Mediante la prueba de -- Duncan se determinó que la disminución de la movilidad -- fué mayor ($P < 0.05$) en el grupo testigo y en el tratado -- con DMSO que la mostrada por el semen tratado con glicerol y la combinación de éste compuesto con DMSO (Gráfica 1).

En el Cuadro 5 se observa que la movili--

dad fué afectada ($P < 0.01$) por el tratamiento empleado y por la etapa, así como por la interacción de estos dos factores.

4.2- Daño Acrosomal:

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal en las diferentes etapas de los cuatro tratamientos se presenta en el Cuadro 6. Se puede ver en él que los espermatozoides normales observados en el semen antes de diluir (fresco) no fué significativamente diferente ($P > 0.05$) en los cuatro tratamientos. Al realizar la dilución y enfriamiento del semen, se observó una disminución altamente significativa ($P < 0.01$) en el porcentaje de dichos espermatozoides en los cuatro tratamientos. Al realizar la prueba de Duncan se determinó que esta -- disminución fué igual ($P < 0.05$) en todos los tratamientos.

La proporción de espermatozoides con acrosoma normal, presentes al descongelar el semen, fué significativamente inferior ($P < 0.01$) a la observada en el semen diluido y enfriado. Por medio de la prueba de Duncan se determinó que la disminución de los espermatozoides normales, fué mayor ($P < 0.05$) en el semen tratado con DMSO y el tratado con la combinación de glicerol y DMSO-

que la observada en el grupo testigo y el tratado con -- glicerol (Gráfica 1).

En el Cuadro 7, se observa que la proporción de espermatozoides con acrosoma normal fué afectado ($P < 0.01$) por la etapa y por el tratamiento, así como por la interacción de estos dos factores.

4.3- Correlaciones:

La correlación existente entre la movilidad espermática y los espermatozoides con acrosoma normal es muy baja en las diferentes etapas de los cuatro - tratamientos, no encontrándose significancia estadística (Apéndices 1,2,3 y 4). Sin embargo, se encontró una alta correlación entre la movilidad espermática del semen --- fresco y los espermatozoides con acrosoma normal al descongelado, en los tratamientos I y III ($r = 0.75^{**}$ y --- $r = 0.80^{**}$, respectivamente); en los tratamientos II y IV la correlación fué sumamente baja ($r = 0.05$ NS y $r = 0.02$ -NS, respectivamente). La ecuación de regresión entre la movilidad espermática del semen fresco y los espermato-- zoides normales al descongelar del tratamiento III (Gráfica 2) es: $Y = -278.78 + 3.72X$ la cual es altamente signi- ficativa ($P < 0.01$).

CUADRO N°4

Movilidad espermática (%) de semen diluido en yema de huevo-tris con diferentes crioprotectores (media + D.E.).

ETAPA	n	CRIOPROTECTOR				SIGNIFICANCIA EST.
		TESTIGO	DMSO	GLICEROL	GLICEROL+DMSO	
Antes de diluir	16	91.5+3.9(a,1)	89.6+4.9(a,1)	90.6+3.0(a,1)	91.8+3.0(a,1)	N.S.
Diluido y enfriado a 5°C	16	84.3+5.7(a,2)	81.5+5.6(a,2)	81.2+5.3(a,2)	81.8+6.2(a,2)	N.S.
Descongelado	16	0.3+0.8(a,3)	3.0+3.3(a,3)	31.2+11.1(b,3)	25.7+14.7(b,3)	**
SIGNIFICANCIA ESTADISTICA		**	**	**	**	

** (P<0.01); * (P<0.05); N.S. (P>0.05).

(1,2,3) Prueba de Duncan por etapa (P<0.05). (a,b) Prueba de Duncan por tratamientos (P<0.05).

CUADRO N°5

Análisis de varianza para el factor movilidad.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA.
Total	191	240726.453		
Carnero	3	201.057	67.02	N.S.
Tratamiento	3	3659.057	1219.69	**
Etapa	2	220576.781	110288.39	**
Carnero x Tratamiento	9	381.588	42.40	N.S.
Carnero x Etapa	6	76.802	12.80	N.S.
Tratamiento x Etapa	6	8290.927	1381.82	**
Carnero x Tratamiento x Etapa	18	378.489	21.03	N.S.
Error	144	7161.750	4973.00	

** (P<0.01); * (P<0.05); N.S. (P>0.05).

CUADRO N°6

Porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal en semen diluido en yema de huevo-
tris con diferentes crioprotectores (media \pm D.E.).

ETAPA	n	CRIOPROTECTORES				SIGNIFICAN- CIA EST.
		TESTIGO	DMSO	GLICEROL	GLICEROL+DMSO	
Antes de diluir	16	95.4 \pm 2.9(a,1)	96.8 \pm 1.9(a,1)	95.5 \pm 4.9(a,1)	95.8 \pm 2.9(a,1)	N.S.
Diluido y enfria- do a 5°C	16	84.1 \pm 7.6(a,2)	87.0 \pm 5.5(a,2)	87.5 \pm 5.4(a,2)	83.9 \pm 7.8(a,2)	N.S.
Descongelado	16	57.6 \pm 13.9(a,3)	37.5 \pm 15.3(b,3)	58.5 \pm 14.3(a,3)	33.3 \pm 18.4(b,3)	**
SIGNIFICANCIA ESTADISTICA		**	**	**	**	

** (P<0.01); * (P<0.05); N.S. (P>0.05).

(1,2,3) Prueba de Duncan por etapas (P<0.05). (a,b) Prueba de Duncan por tratamientos (P<0.05)

CUADRO N°7

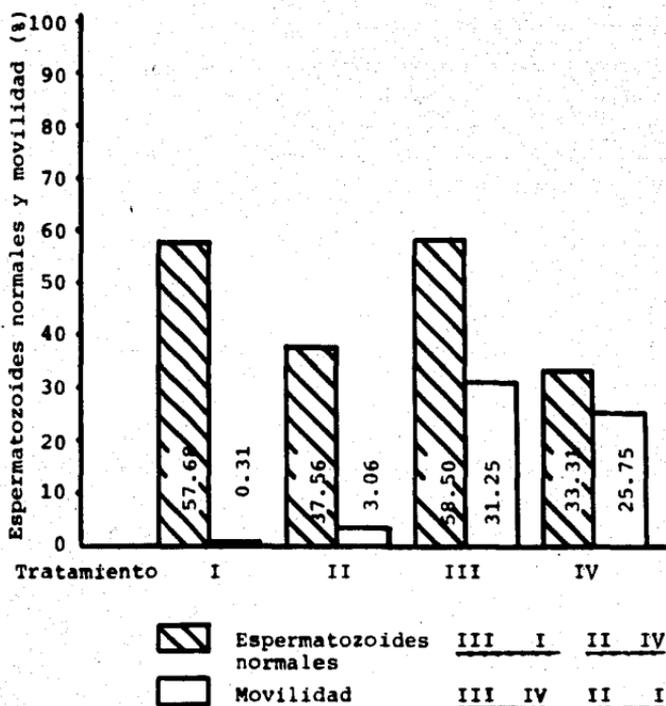
Análisis de varianza para espermatozoides con acrosoma normal.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
Total	191	112553.916		
Carnero	3	581.541	193.84	N.S.
Tratamiento	3	2856.541	952.81	**
Etapa	2	85983.760	42991.88	**
Carnero x Tratamiento	9	819.333	91.04	N.S.
Carnero x Etapa	6	1159.739	193.29	N.S.
Tratamiento X Etapa	6	5690.614	948.43	**
Carnero x Tratamiento x Etapa	18	641.885	33.66	N.S.
Error	144	14820.500	102.92	

** (P<0.01); * (P<0.05); N.S. (P>0.05).

GRAFICA N° 1

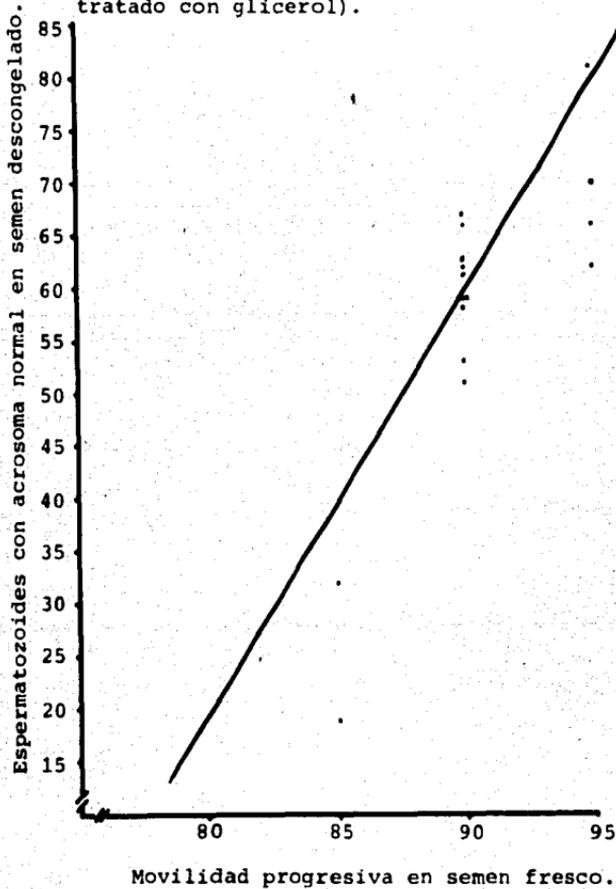
Espermatozoides con acrosoma normal y movilidad al descongelado.



($P < 0.05$)

GRAFICA N° 2

Correlación y Regresión entre espermatozoides con acrosoma normal en semen descongelado y -
movilidad progresiva del semen fresco. (Semen-
tratado con glicerol).



$$r=0.80^{**} \quad Y=-278.78+3.72X^{**}$$

** (P<0.01)

V DISCUSION

Como se puede observar en el Cuadro 4 hubo una disminución de la movilidad cuando el semen fué diluido y enfriado, así como al descongelar. Mann (21) cita como posibles causas de esta disminución, la remoción o alteración de componentes celulares y a un trastorno en el intercambio iónico, involucrando el potasio y quizás a los fosfatos que se observan en la dilución del semen. Es posible que el mecanismo de inactivación espermiática por dilución y lavado, sea básicamente parecido al envejecimiento del espermatozoide cuando es almacenado. En el semen de mamíferos, este fenómeno se caracteriza por hinchamiento y degeneración del complejo lipoprotéico, seguido por cambios físicos y químicos, como la oxidación de grupos sulfidrilos intracelulares, esenciales para la movilidad normal; disminución en el contenido de coenzimas vitales como el ATP e incremento en la permeabilidad espermiática, lo cual ocasiona la pérdida de proteínas intracelulares (21).

Al disminuir la temperatura la movilidad disminuye. Esta disminución no se debe considerar causada por un choque térmico, ya que se ha observado que temperaturas inferiores a 0°C no provocan este choque, si la disminución térmica ocurre lentamente. La yema de hue

vo protege eficientemente al espermatozoide contra un posible choque térmico durante el enfriamiento (21).

No se encontró una diferencia significativa ($P > 0.05$) en la movilidad del semen enfriado y diluido con los diferentes crioprotectores, por lo que no es posible atribuirles a estos, un efecto directo sobre la movilidad espermática en esta etapa.

Al descongelar el semen, se encontró que la movilidad de los espermatozoides congelados con glicerol fué mayor (31.25%) a la observada en aquellos en que se utilizó la combinación glicerol-DMSO (25.75%), aunque la diferencia no fué estadísticamente significativa ---- ($P > 0.05$). Mediante el empleo del DMSO como crioprotector se observó una baja movilidad (3.06%) al descongelar, la cual fué diferente ($P < 0.01$) a la encontrada en los grupos anteriores (Gráfica 1). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Snedeker y Gaunya (33), ya que igualmente observaron una mejor recuperación espermática mediante el empleo de glicerol y su combinación con DMSO - (36 y 34% respectivamente) que la encontrada en espermatozoides congelados unicamente con DMSO (24%) ya que este compuesto es más tóxico para el espermatozoide que el glicerol (30).

Es posible observar que mediante el empleo de crioprotectores para la congelación de semen, mejo-

ra la recuperación de la movilidad espermática, ya que el semen testigo tuvo una recuperación prácticamente nula (Gráfica 1, Cuadro 4).

Como se observa en el Cuadro 6, hubo una disminución estadísticamente significativa del número de espermatozoides con acrosoma normal en todos los tratamientos al diluir y enfriar el semen. Esto concuerda con lo descrito por Tasseron et al. (34) y posiblemente se deba al hinchamiento y degeneración del complejo lipoproteico que trae consigo la dilución (21) aunado al efecto del descenso de temperatura (34). La disminución de espermatozoides con acrosoma normal en esta etapa, fué igual en los cuatro tratamientos por lo que no es posible atribuirle a cada crioprotector un efecto sobre los espermatozoides en esta etapa.

Al descongelar, se aprecia una considerable disminución de espermatozoides con acrosoma normal con los diferentes crioprotectores (Gráfica 1) esto coincide con la observación hecha por Tasseron et al. (34).- Así tenemos que el semen tratado con glicerol presentó mayor número de espermatozoides normales ($P < 0.01$) que el semen tratado con DMSO o con glicerol-DMSO. Esto es semejante a lo citado por Jones (12).

Es interesante hacer notar que el daño acrosomal encontrado en el grupo testigo y en el tratado-

con glicerol fué igual ($P < 0.05$; Gráfica 1). Esto difiere de lo publicado por Meryman (23) quien menciona que - mediante el uso de crioprotectores se reduce el daño celular debido a la congelación. Con el empleo de DMSO y - glicerol-DMSO, el número de espermatozoides con acrosoma normal se reduce. Es posible que el DMSO tenga un efecto nocivo sobre el acrosoma, siendo inocuo el glicerol para esta estructura. Posiblemente la acción de los crioprotectores es más importante para preservar la movilidad - espermática que la integridad acrosomal; tal vez, protegiendo estructuras directamente relacionadas con la supervivencia de las células o con su movilidad, que se verifican afectadas por la congelación en ausencia de un crioprotector.

La baja correlación existente entre las - variables en estudio en las diferentes etapas de la congelación indica la presencia de células normales móviles e inmóviles en el eyaculado, por lo que es necesario que en la evaluación del semen se incluya la observación del estado acrosomal.

Por otro lado, la correlación entre la movilidad del semen fresco y los espermatozoides con acrosoma normal al descongelado en el tratamiento III fué alta ($r = 0.80^{**}$; Gráfica 2; Apéndice 3) esto indica que es posible mediante la evaluación de la movilidad progresi-

va del semen fresco predecir el número de espermatozooides normales al descongelado cuando se emplea como crioprotector el glicerol. Igualmente en el semen que se congeló prescindiendo de crioprotector, la correlación entre las variables antes mencionadas es alta ($r = 0.75^{**}$; - Apéndice 1). Sin embargo, esta correlación no tiene ninguna utilidad ya que la movilidad al descongelado es --- prácticamente nula (0.31%).

Aunque el acrosoma no toma parte en la movilidad del espermatozoide es posible que esta alta correlación se deba a que durante el proceso de congelación los espermatozoides inmóviles con acrosoma normal - emitidos en el eyaculado, sufran daño en esta estructura igual que aquellos que mueren debido al tratamiento.

IV CONCLUSIONES

- 1.- Para la congelación de semen de carnero, utilizando el diluyente yema de huevo-tris, el glicerol resulta ser el crioprotector más adecuado de los probados en este trabajo. Esto lo evidencia tanto la movilidad (31.25%) como los espermatozoides con acrosoma normal (58.5%) presentes en el semen tratado con este compuesto.
- 2.- El DMSO solo o en combinación con el glicerol disminuye la movilidad espermática y daña el acrosoma.
- 3.- La yema de huevo adicionada al diluyente, protege al acrosoma durante el proceso de congelación, pero la movilidad disminuye notablemente si no se adiciona un crioprotector.
- 4.- La adición del glicerol como crioprotector es más importante para proteger las estructuras relacionadas con la movilidad que para el acrosoma.
- 5.- Es necesario incluir en la evaluación del semen la observación de acrosomas, ya que la movilidad espermática en semen fresco tiene una correlación muy baja con los espermatozoides normales ($r = 0.08$ NS).
- 6.- Existe evidencia de que mediante la evaluación de la movilidad progresiva del semen fresco, es posible predecir el número de espermatozoides normales al --

descongelado del semen tratado con glicerol. Sin embargo es necesario que se haga un estudio en el que se utilice una muestra mayor que la analizada en este trabajo.

A P E N D I C E S

CUADRO N°8

Coefficiente de correlación entre espermatozoides normales y movilidad en las diferentes etapas del tratamiento I (n=16).

MOVILIDAD	ESPERMATOZOIDES NORMALES		
	ANTES DE DILUIR	DILUIDO Y ENFRIADO	DESCONGELADO
ANTES DE DILUIR	(a) 0.08	0.56*	0.75**
DILUIDO Y ENFRIADO		0.46	0.25
DESCONGELADO			0.35

** (P<0.01); * (P<0.05).

(a) n= 64

CUADRO N°9

Coefficiente de correlación entre espermatozoides normales y movilidad en las diferentes etapas del tratamiento II (n= 16).

MOVILIDAD	ESPERMATOZOIDES NORMALES		
	ANTES DE DILUIR	DILUIDO Y ENFRIADO	DESCONGELADO
ANTES DE DILUIR	(a) 0.08	0.04	0.05
DILUIDO Y ENFRIADO		0.28	-0.06
DESCONGELADO			0.32

** (P<0.01), * (P<0.05).

(a) n= 64

CUADRO N°10

Coefficiente de correlación entre espermatozoides normales y movilidad en las diferentes etapas del tratamiento III (n= 16).

MOVILIDAD	ESPERMATOZOIDES NORMALES		
	ANTES DE DILUIR	DILUIDO Y ENFRIADO	DESCONGELADO
ANTES DE DILUIR	(a) 0.08	0.12	0.80**
DILUIDO Y ENFRIADO		-0.06	0.52*
DESCONGELADO			0.40

** (P<0.01); * (P<0.05).

(a) n= 64

CUADRO N°11

Coefficiente de correlación entre espermatozoides normales y movilidad en las diferentes etapas del tratamiento IV (n= 16).

MOVILIDAD	ESPERMATOZOIDES NORMALES		
	ANTES DE DILUIR	DILUIDO Y ENFRIADO	DESCONGELADO
ANTES DE DILUIR	(a) 0.08	0.53*	0.02
DILUIDO Y ENFRIADO		0.26	-0.13
DESCONGELADO			0.80**

** (P<0.01); * (P<0.05).

(a) n= 64

LITERATURA CITADA

- 1.- Barr, A.J.; Goodnight, J.H.; Sall, J.P.; Helwig, J. T.: A user's guide to SAS 76. SAS Institute Inc. - Raleigh, North Carolina (1976).
- 2.- Blackshaw, A.W.: The effect of milk diluents on -- the viability of ram spermatozoa and their revival after freezing. Aust. Vet. J. 36: 432-435 (1960).
- 3.- Boehnke, H.J.; Roos, B.; Marré, H. und Pfeilsti--cker, J.: Besamungsbullen und die Tiefgefriertau--lichkeit inder Ejaculate. Analyse einer Jahrespro--duktion. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82: 438-441 - (1975).
- 4.- Colas, G.: Effect of initial freezing temperature, addition of glicerol and dilution on the survival - and fertilizing ability of deep-frozen ram semen.- J. Reprod. Fert. 42: 277-285 (1975).
- 5.- Dirección de Estudios del Territorio Nacional: Car--ta de Climas de la Secretaría de Programación y --Presupuesto. Dirección de Planeación, Comisión de--Estudios del Territorio Nacional. México 14 Q V - (1970).
- 6.- Doebler, G.F. and Rinfret, A.P.: The influence of--protective compounds and cooling and warming condi--tions on hemolysis of eritrocites by freezing and--

- thawing. Biochem. Biophys. Acta 58: 449-458 (1962).
- 7.- Farrant, J.; Walter, C.A.; Heather, Lee; McGann, L.E.
Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. Cryobiology 14: 273-286 (1977).
- 8.- First, N.L.; Henneman, H.A.; Magee, W.T. and Williams, J.A.: The frozen storage of ram spermatozoa. J. Anim. Sci. 20: 74-78 (1961).
- 9.- Hancock, J.L.: The spermatozoa of sterile bulls. J. Exptl. Biol. 30: 50 (1953).
- 10.- Harrison, R.A.P.; Dott, H.M. and Foster, G.C.: Effect of ionic strength serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and surface of mammalian spermatozoa in a single medium. J. Reprod. Fert. 52: 65-73 (1978).
- 11.- Healey, P.: Effect of freezing on the ultrastructure of spermatozoa of some domestical animals. J. Reprod. Fert. 18: 21-27 (1969).
- 12.- Jones, R.: The use of Dimethyl sulfoxide, glycerol and reconstituted skim milk for the preservation of ram spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 18: 887-900 (1965).
- 13.- Jones, R. and Mann, T.: Lipid peroxidation in spermatozoa. Proc. R. Soc. B. 184: 103-107 (1973)
- 14.- Jones, R. and Mann, T.: Lipid peroxides in spermato-

- zoa, formation, role of plasmalogen and fisiological significance. Proc. R. Soc. B. 193: 317-333 (1976)
- 15.- Jones, R. and Mann, T.: Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. J. Reprod. Fert. 50: 261-268 (1977).
- 16.- Kendrick, J.W.: Semen handling and evaluation. En Temas Selectos en Reproducción. Fac. Med. Vet. Zoot. - UNAM (1978).
- 17.- Linford, E.; Clover, F.A.; Bishop, C. and Stewart, D. L.: Relationship between semen evaluation methods -- and fertility in the bull. J. Reprod. Fert. 47: 283-291 (1976).
- 18.- Locksley, E.M.: Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiology -- 15: 382-390 (1978).
- 19.- Lovelock, J.E. and Bishop, M.W.H.: Prevention of freezing damage to living cells by Dimthyl sulfoxide. - Nature 183: 1394 (1959).
- 20.- Mcpherson, J.M.: Extenders and sperm metabolism. En Proc. 1st. Tech. Conf. NAAB pp.24 (1966).
- 21.- Mann, T.: The biochemistry of semen and of the male-reproductive tract. 1st. Ed. Matheuen and Co. Ltd. - (1964).
- 22.- Mazur, P.; Leibo, S.P. and Chu, E.H.Y.: A two-factor hypothesis of freezing injury. Exp. Cell Res. 71: -

- 345- (1972).
- 23.- Meryman, H.T.: Cryobiology. Academic Press. London - and New York (1966).
- 24.- Meryman, H.T.: Cryoprotective agents. Cryobiology. - 8: 173-183 (1971).
- 25.- Moreno Chan, R.: Estado actual y perspectivas de la producción ovina en México. Vet. Méx. 7: 136-141 (1976).
- 26.- Page, R.D.; Gembauer, M.R.; Snedeker, H.W. and Gaunya, W.S.: Dimethyl sulfoxide as a freezing additive for bovine semen. J. Dairy Sci. 51: 949-950 (1968)
- 27.- Rohlof, D.: Untersuchungen zur Konservierung von -- Ebersamen mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Zuchthygiene- 2: 112 (1967).
- 28.- Roubal, W.T. and Tappel, A.L.: Damage to proteins - enzymes and amino acids by peroxidising lipids. Archs. Biochem. Biophys. 113: 5-8 (1966).
- 29.- Salamon, S. and Visser, D.: Recent advances in the - deep-freezing of ram semen. S. Afr. J. Sci. 4: 275-288 (1974).
- 30.- Sherman, J.K.: Dimethyl-sulfoxide as a protective agent during freezing and thawing of human spermatozoa. Fed. Proc. 23: 362 (Abstract, 1964).
- 31.- Sherman, J.K. and Liu, K.C.: Relation of ice to ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of rough

- endoplasmic reticulum. *Cryobiology* 13: 599-608 - (1976).
- 32.- Simmet, L.: Konfektionierung von Bullensperma in Kunststoffröhrchen nach der Landshuter Methode. Tierärztl. Umschau 2: 88-90 (1972).
- 33.- Snedeker, W.H. and Gaunya, W.S.: Dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for freezing bovine semen. J. Anim. Sci. 30: 953-956 (1970).
- 34.- Tasseron, F.; Amir, D.; and Shindler, H.: Acrosome - damage of ram spermatozoa during dilution, cooling - and freezing. J. Reprod. Fert. 51: 461-462 (1977)
- 35.- Valencia, J.; Mendoza, G.; Barrón, C.; Fernandez-Baca, S.: Manejo y reproducción de ovinos en la región del Ajusco, México, D.F. Vet. Méx. 9: 85-90 (1978).
- 36.- Vazquez, R.F.: Aktivitätsbestimmung des akrosomales - Enzimes Akrosin und deren Brauchbarkeit in der spermatologischen Diagnostik im Rahmen der-Tiefgefrier--konservierung von Kaninchensperma. Hannover. Tierärztl. Hochschule, Diss. (1978).
- 37.- Watson, P.F. and 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).
- 38.- Wellhausen, J.E.: The Agriculture in México. Scientific American 235: 134-135 (1976).

- 39.- Willis, E.D.: Effect of unsaturated fatty acids and their peroxides on enzymes. Biochem. Pharmacol. 7: 7-16 (1961).