

93
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**MOTILIDAD Y DAÑO ACROSOMAL DEL SEMEN
CAPRINO CONGELADO EN PAJILLA FRANCESA
DE 0.25 MILILITROS Y DESCONGELADO A
DIFERENTES RITMOS DE TEMPERATURA.**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la

Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

por

MANUEL EDUARDO GONZALEZ GARCIA



ASESOR: M.V.Z. JAVIER VALENCIA MENDEZ

MEXICO, D. F.

1990



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.

C O N T E N I D O

	Página.
RESUMEN.....	1
INTODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	13
DISCUCION.....	14
LITERATURA CITADA.....	17

RESUMEN.

González García Manuel Eduardo. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajilla francesa de 0.25 mililitros y descongelado a diferentes ritmos de temperatura. (bajo la dirección del M.V.Z. Javier Valencia).

El objetivo del presente trabajo fué comparar la motilidad progresiva espermática y daño acrosomal del semen caprino descongelado en pajilla francesa de 0.25 mililitros con dos diferentes ritmos de descongelamiento. El experimento se realizó en el Departamento de Reproducción e Inseminación Artificial de la F.M.V.Z. y el "Rancho Cuatro Milpas" (C.M.E.1.Z.) de la U.N.A.M. Se utilizaron 4 sementales caprinos: 1 Saanen, 2 Anglo-Nubio y 1 Alpino. El semen se obtuvo por medio de la vagina artificial, se evaluó y diluyó con el diluyente con base Tris, ácido cítrico, D-glucosa, glicerina y yema de huevo. El semen fué diluido en un paso a temperatura ambiente y congelado en pajilla francesa de 0.25 mililitros con 100 millones de espermatozoides móviles. De las 144 pajillas congeladas, 72 se descongelaron a 37 ° C durante 12 a 15 segundos y 72 pajillas a 55 ° C durante 4 segundos. En todas las pajillas descongeladas se evaluó la motilidad progresiva espermática y daño acrosomal. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba de la Mediana. Se obtuvo 59.06% de motilidad progresiva espermática y 10.44% de daño acrosomal en el semen descongelado a 37 ° C por 12 a 15 segundos y 59.95% de motilidad progresiva espermática y 10.01% de daño acrosomal en semen descongelado a 55 ° C por 4 segundos.

Aunque no existió diferencia significativa entre los dos grupos, el descongelamiento del semen a 37 °C por 12 a 15 segundos es más fácil de realizar e implica menor riesgo cuando se trabaja a nivel de campo.

INTRODUCCION

La congelación de semen es una práctica común en la mayoría de las especies domésticas sin embargo el ganado caprino es una de las especies menos beneficiadas por esta técnica, probablemente debido a que la cabra por lo general se encuentra en poder de pequeños productores (26).

Existen muchas técnicas de congelamiento de semen y éstas varían de una especie a otra y del diluyente que se desea utilizar. Hasta la fecha los diluyentes que han mostrados ser los más eficientes son los que están elaborados a base de yema de huevo o leche descremada o una combinación de ambos (15, 26).

La concentración del eyaculado del caprino varía de $2 \text{ a } 6.5 \times 10^9$ espermatozoides por mililitro y tiene un volumen promedio de un mililitro (12, 15, 24).

Durante la monta natural el macho deposita varios miles de millones de espermatozoides en la vagina de la hembra y los que logran pasar a cérvix son aproximadamente de 100 a 140 millones de espermatozoides (24), razón por la cual en la inseminación artificial el mínimo de espermatozoides móviles descongelados debe ser de 180×10^6 depositados en cérvix (24). También se han obtenido buenos resultados con dosis menores de 50×10^6 y 120×10^6 de espermatozoides móviles descongelados (22).

El semen ha sido congelado en tres diferentes presentaciones: pajillas, ampollitas y pellets (12, 15, 24, 28) y el método de pajillas o popotes se han usado diferentes concentraciones y con diferente volumen sin embargo no es posible extrapolar los

resultados obtenidos en el congelamiento y descongelamiento de una a otra presentación.

Se ha cuestionado a menudo acerca de cuál es el mejor diluyente para congelar el semen caprino y en todos los casos se han tomado dos parámetros para su evaluación después de descongelar el semen, que son la motilidad progresiva espermática y el daño acrosomal (2, 5, 6, 10, 11, 22, 25, 29).

El semen de carnero, cerdo y del macho caprino tolera un amplio rango de concentración de Tris (hidroximetil) aminometano en el diluyente para congelar (25).

La yema de huevo o leche descremada aumentan la supervivencia espermática durante la congelación o enfriamiento rápido (15, 18), además de que contiene nutrientes para los espermatozoides. Las lecitinas y lipoproteínas de la yema de huevo son las responsables de evitar el efecto negativo que produce choque frío a las células espermáticas cuando se enfrían de la temperatura corporal a 5 °C (15, 24, 26). La caseína es una proteína de la leche que sirve como agente de prevención contra el efecto nocivo del choque térmico para los espermatozoides (19).

El tipo de azúcar que dió mejor resultado fué la D-glucosa y fructosa en comparación con la rafinosa y la lactosa (5). Se encontró en un estudio que la cantidad de azúcar requerida en el medio Tris fué relativamente pequeña (25).

El glicerol protege al espermatozoide contra los efectos nocivos de la congelación, ya que evita desplazar el agua durante la formación de hielo evitando el aumento de

concentración intracelular de solutos (9). También provoca que la formación de los cristales de hielo sean en forma de capas en vez de agujas que lesionen los espermatozoides, lisándolos (28). La incorporación del glicerol al semen es un proceso delicado que debe hacerse en forma gradual; en la literatura menciona que el semen se puede diluir en dos pasos agregando la parte que no contiene glicerol a temperatura ambiente y el medio glicerolado después de enfriar a 5 °C el semen diluido, (6, 7, 8, 9, 15, 25). También el semen caprino se ha diluido en un paso (4, 22, 25). Cuando el glicerol se adiciona al diluyente inicial se utiliza diluyente Tris amortiguado, evitando de esta manera la necesidad de grandes cuartos fríos (15). Se encontró en un estudio que es mejor la dilución de un paso a 30 °C con 4 % de glicerol en el semen diluido, obteniendo mejor rango de supervivencia de los espermatozoides al mantenerlo 1.5 horas a 5 °C como periodo de equilibrio y descongelado a 37 °C (25). Sin embargo en una investigación se congeló semen de bovino y se encontró que no había diferencia significativa entre hacer la dilución del semen en 1 o 2 pasos (13).

Debe tenerse mucho cuidado para evitar un rápido enfriamiento de 18 a 5 °C porque dentro de este rango de temperatura, los espermatozoides son particularmente sensibles al choque frío (24). La reducción de la temperatura debe seguir una determinada curva. Esta será tan lenta como para no deshidratar a los espermatozoides y evitar la rápida cristalización intracelular y lo suficientemente rápida para evitar daño

osmótico al exponerlos a un medio hipertónico durante el congelamiento (12).

Con semen caprino se han usado diferentes ritmos de enfriamiento como son, de 35 °C a 5 °C en 1.5 horas (6, 9), en 2.5 y 0.5 horas (6); con semen de carnero 25 °C a 5 °C en 3.5 a 0.5 horas (3).

El periodo de equilibrio sirve para estabilizar el semen diluido, de modo que los espermatozoides estén bien protegidos en el momento de congelar (28). Se menciona que periodos cortos de equilibrio son mejores que los prolongados (28), pero se han trabajado diferentes periodos de equilibrio, que van de 1 hora (9) hasta 20 horas (27).

Debe mantenerse la temperatura constante a 5 °C durante todo el periodo de equilibrio ya que arriba de 5 °C la motilidad y metabolismo no son inhibidos lo suficiente y temperaturas abajo de 0 °C pueden ser fatal para los espermatozoides (24).

Existe una gran controversia en cuanto al lavado o no lavado del plasma seminal ya que existe una enzima denominada fosfolipasa A (coagulasa de la yema de huevo o fosfolidasa) producida por las glándulas bulbouretrales del macho caprino, la cual cataliza la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo a ácidos grasos y lisolecitinas que son tóxicas para los espermatozoides y para reducir este efecto se ha recomendado remover el plasma seminal por medio de lavados (5, 7, 11, 18, 23, 24, 26). Sin embargo unos investigadores encontraron mejores resultados para el semen no lavado, con el que inseminaron hembras sincronizadas obteniendo 71.4% de pariciones con semen no lavado

y 61.1% con semen lavado, usaron una dosis con una concentración de 60×10^6 de espermatozoides móviles descongelados a 37°C y depositados entre 1.5 a 3.0 centímetros dentro del cérvix (22). En otro trabajo en que se inseminaron 48 cabras se obtuvo una tasa de pariciones del 66.7% en aquellas inseminadas con semen no lavado y del 54.2% para aquellas inseminadas con semen congelado lavado (29).

En un estudio en el que se usó un diluyente con yema de huevo y se congeló semen no lavado, al descongelarlo se obtuvo $69.65 \pm 0.54\%$ de motilidad progresiva espermática y $10.33 \pm 1.43\%$ de daño acrosomal, el descongelado del semen fue hecho a 37°C por 12 a 15 segundos (9). En otro reporte se encontró $12.37 \pm 1.05\%$ de daño acrosomal en semen no lavado descongelado a 37°C por 12 a 15 segundos (7).

Es necesario tomar en cuenta que la determinación del daño acrosomal es sumamente importante, pues no está relacionado con la motilidad de los espermatozoides, los cuales pueden tener buena motilidad y tener dañado el acrosoma (24).

El daño acrosomal varía con el método de congelamiento y descongelamiento (24). El borde apical del acrosoma del espermatozoides de toro, carnero y del macho caprino se deterioran con la edad (15) por lo que se puede confundir, si el daño fue causado por el procedimiento de congelamiento o descongelamiento, por tal razón, se debe analizar el daño acrosomal antes del congelamiento y después del descongelamiento para saber realmente cuál fue el daño producido. El daño

acrosomal puede ser medido por medio del microscopio óptico usando técnicas especiales de tinción, eosina-nigrosina o Giemsa, aunque puede evitarse la tinción utilizando el microscopio de contraste de fases o el electrónico (15, 24).

La motilidad circular es con frecuencia signo de choque frío o de un medio que no es isotónico con el semen, con frecuencia ocurren en motilidad oscilatoria en espermatozoides viejos o que están muriendo (15).

Se han desarrollado métodos fotoeléctricos y electrónicos para observar la velocidad de las células espermáticas, los patrones de desplazamiento y la proporción de espermatozoides con movimiento conforme pasan por un fototubo y estos valores se correlacionan con la fertilidad (15).

La temperatura y tiempo de congelamiento y descongelamiento del semen resulta ser muy crítico ya que repercute directamente en la viabilidad e integridad del espermatozoide (14, 20, 24). Además no puede medirse técnicamente el daño producido durante los procesos de congelamiento y descongelamiento por separado (24).

El congelamiento en sí, cuando se realiza de modo correcto, tiene escasos efectos sobre la ultraestructura de las células espermáticas, lo que ha sido demostrado mediante microscopía electrónica (28), pero el congelamiento inadecuado puede dañar el acrosoma y las membranas celulares (15). Como regla general, el rápido congelamiento del semen en pajillas es superior que un lento congelamiento (14, 20).

En general se ha observado que con descongelamientos rápidos

se obtienen resultados más favorables en la motilidad e integridad acrosomal del espermatozoide (13, 14, 20, 24); por lo que en el presente trabajo se espera encontrar diferencia significativa entre los dos diferentes ritmos de descongelamiento (37 °C durante 12 a 15 segundos y 55 °C durante 4 segundos), obteniendo resultados más favorables al descongelar con la temperatura más alta (55 °C por 4 segundos).

Para el descongelado del semen caprino en pajillas se han usado diferentes temperaturas y tiempos de descongelamiento a 35 °C / 2 minutos (en pajilla francesa de 0.25 ml con 100 X 10⁶ de espermatozoides móviles con semen lavado) obteniendo 50.4 ± 4.7% en motilidad progresiva espermática y 66.07 ± 5.06 % de acrosomas normales (18); a 37 °C / 12-15 segundos (pajilla de 0.5 ml con semen no lavado) con 12.37 ± 1.84 % de daño acrosomal (7), en pajilla de 0.5 ml (semen lavado) con 13.83 ± 1.05 % de daño acrosomal (8) y en otro trabajo en el que descongelaba 37 °C / 12-15 segundos semen no lavado (pajilla de 0.5 ml) se obtuvo 64.86 ± 0.51 % de motilidad progresiva espermática y 8.64 ± 0.49 % de daño acrosomal en este trabajo se encontró que después del descongelado el porcentaje de motilidad progresiva espermática se incrementaba significativamente conforme el periodo de equilibrio aumentaba de 1 a 5 horas (9), en otro estudio en el que se descongeló a 37 °C / 12-15 segundos se encontró menor daño acrosomal con semen no lavado (8.10 ± 1.5%) que con el semen lavado (11.20 ± 1.42 %) (10).

El grado óptimo de descongelamiento depende de la

concentración de glicerol, el tiempo de equilibrio, del tamaño de la pajilla y el tipo de diluyente (13).

Existen muy pocas investigaciones en las que se han comparado diferentes temperaturas y tiempos para la descongelación del semen del carnero (1) y son aún menores los realizados con semen caprino. por lo que el presente trabajo tiene como justificación el comparar la motilidad progresiva espermática y daño acrosomal del semen caprino descongelado en pajilla francesa de 0.25 ml con dos diferentes ritmos de descongelamiento (37 ° C durante 12 a 15 segundos y 55 ° C durante 4 segundos).

MATERIAL Y METODOS.

El presente estudio se realizó en el Departamento de Reproducción e Inseminación Artificial de la F.M.V.Z. y en el C.N.E.I.Z. "Rancho Cuatro Milpas" de la U.N.A.M.

Se trabajaron 16 eyaculados obtenidos de 4 sementales caprinos de las razas: 1 Saanen, 2 Anglo-Nubio y 1 Alpino, el semen se colectó dos veces por semana durante dos semanas.

por medio de una vagina artificial de 15 centímetros de largo por 5.5 centímetros de ancho, que tiene en uno de sus extremos un tubo recolector estéril graduado y seco que tenía una temperatura de 30 a 37 ° C antes de recibir el eyaculado (24), la vagina artificial estaba a una temperatura interna de 42 a 45 ° C (15, 24, 26).

Después de recolectar el semen, se igualaron las temperaturas del semen y diluyente manteniendolos en el mismo baño María a 37 ° C (24), se tomó una pequeña muestra de semen para ser analizada e

inmediatamente después se hizo la dilución del semen 1:1 (semen : diluyente), ya que una rápida dilución ayuda a proteger al semen contra el choque frío durante los siguientes minutos (15, 24). Debe siempre añadirse el diluyente al semen, nunca al revés lo cual puede causar choque a los espermatozoides, ya una vez hecha la dilución se mezcló gentilmente (24).

El volumen del eyaculado se midió directamente del tubo recolector, la motilidad progresiva espermática se evaluó con el microscopio óptico, usando el objetivo de 40 X, observando una pequeña gota de semen entre en un portaobjetos y un cubreobjetos precalentados a 37 ° C (1, 15, 24) y manteniendolos a esa temperatura con una botella plana de vidrio y llena con agua a 38 ° C a modo de termoplatina (1). La concentración se determinó con el hemocitómetro (1, 15, 24, 28). El daño acrosomal se analizó diluyendo en 3 ml de solución Hancock (16) una muestra de semen de 0.01 ml, se mezcló, se tomó una pequeña gota de esta mezcla y se colocó entre un portaobjetos y cubreobjetos observándose 100 células espermáticas por campo en el microscopio de contraste de fases con el objetivo de inmersión (100 X), se diferenciaron los espermatozoides con margen apical como acrosomas normales de aquellos que presentaron alguna alteración (3).

Conociendo el volumen eyaculado, porcentaje de motilidad progresiva espermática y concentración espermática se procedió a la dilución final para obtener 100×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva en 0.25 ml (18, 24, 25).

El semen se diluyó con el siguiente diluyente: Solución Madre

(Tris (Hidroximetil) amino metano 18.02 g., D-glucosa 9.978 g., Acido citrico 7.44 g y agua bidestilada c.b.p. 500 ml); de esta solución se tomaron 35 ml y se añadieron 10 ml de yema de huevo, 3.5 ml de glicerol y 0.03 ml de Pasta Orvus (O.E.P. Orvus Paste) (29).

Ya que el semen se encontraba diluido se procedió al llenado de las pajillas de 0.25 ml a una concentración de 100×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva (18), posteriormente se sellaron con alcohol polievinilico (15, 24, 28). Es importante dejar un pequeño espacio de aire dentro de la pajilla antes de sellarla (15, 24), este espacio se hizo por desplazamiento de volumen introduciendo la punta de peine especial en la pajilla (24).

Una vez llenadas y selladas las pajillas se enfriaron en una posición horizontal dentro de un refrigerador envueltas en una toalla de papel a una temperatura constante de 5°C donde se mantuvieron por 2 horas como periodo de equilibrio (18, 27, 28). Para el congelamiento del semen se expusieron las pajillas a vapores de nitrógeno líquido colocandolas a 5 centímetros arriba del nivel del nitrógeno líquido durante 10 minutos (9) e inmediatamente fueron sumergidas en nitrógeno líquido (9, 18, 24). donde permanecieron por 30 días.

El semen se descongeló con dos diferentes ritmos de temperatura a 37°C /12-15 segundos y 55°C /4 segundos. Se evaluó la motilidad progresiva espermática y daño acrosomal en la forma ya descrita y los resultados fueron analizados por medio de * Orvus-Paste. Protector & Glamble. México, S.A.

la prueba de la Mediana para muestras independientes y calculando para cada muestra el número de observaciones que están por debajo y por encima de la mediana combinada y estas frecuencias se arreglan en una tabla de contingencia de 2×2 . Aplicando la fórmula corregida de Yates para tablas de contingencia de 2×2 y apoyados en la prueba de ji-cuadrada con un grado de libertad y un nivel de significación de $\alpha = 0.05$ (17, 30).

RESULTADOS.

Se observó que la motilidad progresiva espermática fué de 59.06 y 59.95 % (Cuadro 1) y el daño acrosomal fué de 10.44 y 10.01 % (Cuadro 2) al descongelar a 37 °C / 12 a 15 segundos y 55 °C / 4 segundos respectivamente.

Comparando los resultados no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los dos ritmos de descongelamiento.

Cuadro 1 ; Evaluación del movimiento progresivo espermático del semen fresco y semen descongelado a 37 °C/ 12-15 segundos y 55 °C/4 segundos.

RAZA	SEMEN FRESCO	MOVIMIENTO PROGRESIVO 37 °C/12-15seg	ESPERMATICO 55 °C/4seg.	Nº. DE PAJILLAS DESCONGELADAS
SAANEN (1)	77.5%	62.0%	63.75%	18
ANGLO-NUBIO (2)	81.25%	61.25%	63.75%	18
ANGLO-NUBIO (3)	80.0%	63.0%	63.33%	18
ALPINO (4)	81.0%	50.0%	49.0%	18
PROMEDIO X	79.93%	59.06%	59.95%	18

Cuadro 2 : Evaluación del daño acrosomal del semen fresco y descongelado a 37 °C/12-15 seg y 55 °C/4 seg.

RAZA	SEMEN FRESCO	DANO ACROSOMAL		No. DE PAJILLAS DESCONGELADAS.
		37 °C/12-15 seg	55 °C/4 seg	
SAAMEN (1)	5.5%	9.94%	9.61%	18
ANGLO-NUBIO (2)	3.5%	10.11%	10.0%	18
ANGLO-NUBIO (3)	5.2%	9.72%	9.44%	10
ALPINO (4)	3.7%	12.0%	11.0%	18
PRONEDIO X	4.47%	10.44%	10.01%	18

DISCUSION.

El semen congelado en este estudio no le fué retirado el plasma seminal, aunque algunos investigadores recomiendan que para que no exista coagulación de la yema de huevo, se tiene que remover el plasma seminal mediante lavados, usando para ello la centrifugación (8, 10, 11, 18, 22, 24, 29), pero este proceso es muchas veces poco práctico (24), además que la centrifugación tiene un efecto negativo sobre el acrosoma (29). Se observó que la frecuencia de acrosomas hinchados fué más alta ($P < 0.01$) en los ejemplos congelados sin plasma seminal (11.20 + 1.42%) que en los ejemplos congelados con plasma seminal (8.10 + 1.50%) (10). Otros investigadores encontraron 71.4% de partos para semen congelado no lavado contra 61.1% de partos con semen lavado dos veces (22).

En otro trabajo se encontró menor daño acrosomal para el semen no lavado que para el que sí se lavó (18). Unos investigadores encontraron que no había diferencia significativa en el porcentaje de espermatozoides vivos y motilidad progresiva entre el semen lavado y no lavado (10). Otros mencionan que existe una pérdida del 6% de espermatozoides durante los procesos de lavado (21).

Si la concentración de la yema de huevo no excede del 2.0% en el semen diluido, la coagulación de la yema de huevo no ocurrirá y la remoción del plasma seminal antes de la dilución no será necesaria (24). En esta investigación no se observó coagulación de la yema de huevo y la concentración de yema de huevo en el semen diluido si excedió del 2.0% ya que el diluyente utilizado contenía 10 % de yema de huevo (29).

Aparentemente, el método de conservación utilizando (diluciones elevadas, tiempos de equilibrio de solamente dos horas y tasas de refrigeración rápida), hacen al lavado innecesario evitando, de esta forma, el efecto negativo del plasma seminal y de la centrifugación (29).

En un trabajo en el que se descongeló semen caprino a 37 °C durante 12 a 13 segundos (no lavado, diluido en 2 pasos y congelado en pajilla de 0.5 ml) se tuvieron mejores resultados con el ritmo de enfriamiento más lento (de 35 °C a 5 °C en 2.5 horas) con 69.55 - 0.67 % de motilidad progresiva y con el más bajo porcentaje de daño acrosomal (6). En otro estudio se obtuvieron 69.65 - 0.87% de motilidad progresiva y 10.33 - 1.43 %

de daño acrosomal al descongelar semen de igual manera que el estudio anterior pero con un rango de enfriamiento de 35 °C a 5 °C en 1.5 horas (9).

En esta investigación no se tomó el tiempo en que el semen tardó en llegar a 5 °C ya que una vez llenas y selladas las pajillas se envolvieron en una toalla de papel y se metieron en un refrigerador con 5 °C en posición horizontal y a partir de este momento empezó el periodo de equilibrio que fué de 2 horas.

Unos autores mencionan que un rápido descongelamiento es superior a un lento descongelamiento (14, 15, 20, 24), como los resultados obtenidos con semen de bovino, siendo mejor ($P < 0.01$) descongelar a 65 °C / 7.5 seg y 95 °C / 6 seg que descongelar a 35 °C por 10 seg (13). Sin embargo en esta investigación no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) en motilidad progresiva espermática y daño acrosomal al descongelar con 2 diferentes ritmos de descongelamiento (37 °C / 12-15 seg y 55 °C / 4 seg) mismo que se encontró en un trabajo en que se descongeló semen de ovino (1).

Por lo anterior se concluye que al no haber diferencia significativa entre los 2 ritmos de descongelamiento, es posible utilizar ambos, tomando en cuenta que temperaturas altas no pueden ser recomendadas de uso rutinario en campo porque el daño al espermatozoide por un sobrecalentamiento si el tiempo de descongelado no es rigurosamente controlado, por lo tanto el descongelamiento del semen a 37 °C / 12 a 15 segundos es más sencillo, más fácil de realizar e implica menor riesgo cuando se trabaja a nivel campo.

LITERATURA CITADA.

- 1.- Angulo, M.R.: Determinación de la temperatura y tiempos óptimos para la descongelación del semen ovino. Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1988).
- 2.- Borghain, A.C., Deka, B.C., Rajkonwar, C.K.: Preservation of buck semen. Indian Vet. J. 62: 81-82 (1985).
- 3.- Bustamante, C.G.: Acción del Sulfoxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. Tesis de maestría. Fac. Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1980).
- 4.- Choudhury, A.H.; Deka, B.C.; Rajkonwar, C.K.: Effect of diluters on motility and fertility of frozen goat semen. Animal Breeding Abstracts. 56 (3): 201 (1988).
- 5.- Corteel, J.M., and Paquignon, M.: Preservation of the male gamete (ram, buck, boar). Proceedings 10th Intern. Congr. on Anim. and A.I. (Brasil). II: 20-27 (1985).
- 6.- Deka, B.C.; Rao, A.R.: Effect of cooling time on quality of frozen goat semen. Animal Breeding Abstracts. 56 (7): 598 (1988)
- 7.- Deka, B.C., Rao, A.R.: Effect of extenders on freezability of buck semen. Indian J. Anim. Sci. 55 (12): 1035-1040 (1985).
- 8.- Deka, B.C., Rao, A.R.: Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buck semen. Indian Vet. J. 62 (5): 414-417 (1985).
- 9.- Deka, B.C., Rao, A.R.: Effect of glycerol level in Tris-based

- extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. Theriogenology, 26 (2): 231-238 (1986).
- 10.-Deka, B.C., Rao, A.R.: Effect of storage at -196°C on quality of goat semen frozen with and without seminal plasma in Tris-based extender. Animal Breeding Abstracts, 56 (3): 201-202 (1988).
- 11.-Deka, B.C., Rao, A.R.: Motility of buck spermatozoa during preservation at $+5^{\circ}\text{C}$ with and without seminal plasma. Indian Vet. J., 63 (2): 169-170 (1986).
- 12.-Galina, C., Saltiel, A., Valencia, J., Becerril, J.L., Bustamante, C., Calderón, A., Duchateau, A., Fernández, S., Olguin, A., Páramo, R., Zarco, L.: Reproducción de los Animales Domésticos, 1a. ed. Ed. LIMUSA, ISBN 968-18-1954-4 México 1, D.F., 1986.
- 13.- Gilbert, G.R., and Almquist, J.D.: Effect of processing procedures on post-traw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 0.3 ml straws at room temperature. J. Anim. Sci., 46: 225-236 (1978).
- 14.-Graham, E.F.: Fundamentals of preservation of spermatozoa. In: the integrity of frozen spermatozoa. National Academy of Sciences, Washington, D.C., 4-44 (1978).
- 15.-Hafez, E.S.E.: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 4a. ed. Ed. Interamericana, ISBN 968-25-0760-4 México, D.F. 1986.
- 16.-Hancock, J.L.: The spermatozoa of sterile bulls. J. Exptl. Biol., 30: 50 (1953).

- 17.-Marques M.J: Probabilidad y Estadística (Para ciencias Químico-Biológicas). U.N.A.M. ISBN 968-36-0431-5: 495-497 1988.
- 18.-Mushtaq, A., Katherine, N.E., Ott, R.S.: Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, 46 (2): 473-475 (1985).
- 19.-O'Shea, T., and Wales, R.C.: Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 50C on diluted ram and bull semen. *Aust. J. Biol. Sci.*, 19: 871-872 (1966).
- 20.-Pickett, B.W., Berndton, W.E.: Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: A review. *J. Dairy Sci.*, 57: 1287-1302 (1974).
- 21.-Ritar, A.J., Salamon, S.: Effects of seminal plasma and its removal and egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35 (3): 305-312 (1982).
- 22.-Ritar, A.J., and Salamon, S.: Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 36 (1): 49-59 (1983).
- 23.-Roy, A.: Egg yolk coagulating enzyme in the semen and cowper's gland of the goat. *Nature*, 179: 318-319 (1957).
- 24.-Salamon, S.: Salamon's artificial insemination of sheep and goat. *Butterworths Pty Limited*. ISBN 0-409-49177-2 Australia, 1987.
- 25.-Salamon, S., Ritar, A.J.: Deep freezing of Angora goat semen: Effect of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35 (3): 295-303 (1982).

- 26.-Santos, I., Arbiza, A.: Producción de caprinos. 1a. ed. Ed. AGI Editores, ISBN 968-463-037-9 México, D.F. 1986.
- 27.-Sinha, S.N., Singh, B.K., Sinha, A.K.: Post-thaw motility and fertility of frozen sperms of buck of different breeds. Animal Breeding Abstracts., 56 (7): 598 (1988).
- 28.-Sorensen, A.M.: Reproducción Animal: Principios y prácticas. 1a. ed. Ed. Mc. Graw Hill, ISBN 0-07-059670-0 México, D.F. 1986.
- 29.-Velasco, P.J.: Die bedeutug verschiedener samenvorbehandlugen fur die Tiefgefrierkonservierung von Ziegenbocksperma. (Importance of different procedures of the buck semen before freezing for the freeze preservation). Tesis de doctorado, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover. 1985.
- 30.-Wayne, W.D.: Bioestadística (Bases para el análisis de las ciencias de la salud). Ed. Limusa, México, D.F. 1979.