

94
2es

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



"CONGELACION DE SEMEN CAPRINO EN PAJILLAS
FRANCESAS DE 0.5 ml EVALUANDOLO A
DIFERENTES RITMOS DE DESCONGELACION"

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A ;
GUILLERMO GONZALEZ HERRERA



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.

R E S U M E N

"CONGELACION DE SEMEN CAPRINO EN PAJILLAS FRANCESAS DE 0.5 ml. EVALUANDOLO A DIFERENTES RITMOS DE DESCONGELACION"

González Herrera Guillermo.

Asesor: M.V.Z. Javier Valencia.

La presente investigación se realizó con el objetivo de comparar dos diferentes ritmos de descongelación de semen caprino envasado en pajillas de 0.5 ml., evaluando la motilidad progresiva espermática y el porcentaje de daño acrosomal al descongelado. El trabajo se realizó en el departamento de Reproducción e Inseminación Artificial de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. y en el rancho "Cuatro Milpas" (C.N.E.I.Z.) de la U.N.A.M., ubicado en el municipio de Tepotzotlán, Edo. de México. Se analizaron en total 16 eyaculados utilizando 4 sementales caprinos de las razas: 1 Saanen, 2 Anglo-Nubia y 1 Alpino Francesa. El semen se colectó por medio de una vagina artificial, se evaluó y se procedió a diluir. Se usó un diluyente que contiene Tris, Glucosa, Acido cítrico, yema de huevo, Glicerol y O.E.P.(Orvus Pasta). El semen fue diluido a temperatura ambiental y se envasó en pajillas de 0.5 ml. conteniendo en promedio 100 millones de espermatozoides con motilidad progresiva cada una. Después de la dilución del semen se enfrió gradualmente hasta llegar a 5°C, temperatura a la cual se mantuvo en período de equilibrio durante 1.5 hr. y se procedió al congelamiento en vapores de nitrógeno líquido manteniendo las pajillas a 4.5 cm. de la superficie del nitrógeno durante 10 min. Posteriormente se sumergieron en el termo de nitrógeno líquido a -196°C. Después de 30 días de almacenamiento en el termo, de las 144 pajillas que se congelaron, 72 se descongelaron a 37°C por 12-15 seg. y 72 a 55°C por 8 seg. En todas las pajillas descongeladas se

evaluó la recuperación de los espermatozoides observando el movimiento progresivo y el porcentaje de daño acrosomal. El análisis estadístico se realizó por medio de una prueba estadística no paramétrica, empleando la prueba de la mediana y su confirmación con la prueba de X^2 . En las pajillas descongeladas a 37°C el movimiento progresivo de los espermatozoides fue de 62.81% y el daño acrosomal de 9.31%, y en las descongeladas a 55°C por 8 seg. fue de 58.68% y 12.37% para los mismos parámetros, no habiéndose encontrado diferencia significativa entre los dos ritmos ($P \leq 0.05$). Ambos ritmos de temperatura son adecuados para el descongelamiento del semen caprino, sin embargo, a nivel de campo el descongelar a 37°C es más sencillo e implica menos riesgo.

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

El principal objetivo de utilizar el semen fresco o congelado en programas de inseminación artificial es el mejoramiento genético de las poblaciones animales por medio del empleo más eficaz de los sementales seleccionados por su capacidad para transmitir caracteres de importancia económica (13, 18). El uso del semen fresco o congelado puede incrementar el número de hembras inseminadas por se mental por año (24).

Cuando se usa inseminación artificial en cabras, tanto el volu men de la inseminación como el número de espermatozoides que contie ne, pueden ser reducidos en comparación con la monta natural (12). El problema de reducir el número de espermatozoides a la dosis re querida, pero manteniendo el volumen conveniente para la insemina ción, puede solucionarse por medio de la dilución del semen (15). - La concentración del eyaculado del chivo varía de 2 a 6.5×10^9 esper matozoides por mililitro y tienen un volumen promedio de 1 ml. (12, 15). Durante la monta natural los espermatozoides que logran pasar el cér vix son aproximadamente de 100 a 140 millones; por esta razón en la inseminación artificial el mínimo de espermatozoides con moti lidad progresiva al descongelado debe ser de 180×10^6 espermat ozooides depositados en cér vix (24). También se han encontrado buenos resultados con dosis menores como 60×10^6 y 120×10^6 de espermatozoi-- des móti les descongelados (22).

Los diluyentes sintéticos comunmente usados pueden contener - tanto Tris (hidroximetil), como Citrato de sodio, que actúan como amortiguadores del pH. Los glúcidos más usados son la glucosa o la fructosa, y son empleados como fuente de energía (25).

El diluyente ideal debe reunir ciertas características: 1. Pro veer nutrientes como fuente de energía. 2. Contener constituyentes

que brinden protección en contra del daño que causa el enfriamiento y congelamiento. 3. Proveer un buffer para prevenir cambios de pH, así como la formación de ácido láctico. 4. Mantener una adecuada presión osmótica, así como un adecuado balance electrolítico. 5. Sustancialmente incrementar el volumen del semen para multiplicar el número de inseminaciones. 6. Contener antibióticos que inhiban crecimiento bacteriano. 7. Proveer un medio ambiente en el cual las actividades metabólicas del espermatozoide puedan continuar (24).

Dentro de los diluyentes naturales para semen fresco o congelado están: la yema de huevo o leche; o una combinación de los dos como ingredientes básicos. El beneficio principal derivado de la yema de huevo fresca es la protección de la célula espermática en contra del choque frío por poseer lipoproteína y lecitina (21).

Existen dos tendencias al considerar el uso de la yema de huevo como componente del diluyente del semen caprino. Deka y Rao notifican que la han usado, señalando porcentajes de motilidad de 83.83%, 80.46% y 68.43% y un porcentaje de daño acrosomal de 4.42, 7.98 y 13.83% después del enfriamiento del período de equilibrio y del descongelado, respectivamente (8, 9).

Otros investigadores opinan que la yema de huevo es tóxica para el semen caprino cuando se usa como parte del diluyente (4, 23), debido a la presencia de la enzima fosfolipasa (coagulasa de la yema de huevo o fosfolipasa A), producida por las glándulas bulbouretrales del chivo, las cuales catalizan la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo a ácidos grasos y lisolecitinas (1, 23).

Se han realizado estudios empleando semen fresco o congelado con Tris, yema de huevo-ácido cítrico, glucosa o fructosa y glicerol en los que se ha obtenido una motilidad mayor del 60% y un porcenta-

je de 12.37% de acrosomas dañados, después de descongelar a 37°C por 12-15 seg. en pajillas de 0.5 ml. (9). En otros estudios con el mismo diluyente se obtuvo una motilidad de 74.92% y un porcentaje de acrosomas normales de 66.07%, congelando en pajillas de 0.25 ml. (22).

Entre las causas que afectan la viabilidad del semen congelado está la formación de hielo intracelular, tanto en la congelación como en la descongelación. Los espermatozoides pueden sufrir la pérdida de la integridad de las membranas celulares e inactivación de un 20% de enzimas acrosomales y pérdida de los fosfolípidos (2).

Los espermatozoides necesitan para poder ser congelados un crioprotector para que esté presente en el diluyente que se va a usar para congelar. El crioprotector más usado es el glicerol, ya que brinda mayor protección que al utilizar otros, como por ejemplo: el D.M.S.O. (Dimetil-sulfóxido) (3).

La concentración del glicerol requerida para proteger a un máximo de espermatozoides es determinada considerando la velocidad del enfriamiento y el ritmo del descongelamiento. El glicerol evita la remoción de agua durante la formación de hielo, evitando el aumento de la concentración intracelular de solutos (9). El glicerol provoca que la formación de los cristales de hielo sea en forma de capas, en vez de agujas que cortan al espermatozoide lisándolos y provocando su muerte; la incorporación del glicerol al semen es un proceso delicado que debe hacerse en forma gradual (9,11).

La revisión de literatura sobre el mejor diluyente para semen congelado de caprino revela una diversidad de opiniones. En estudios recientes se ha utilizado la motilidad después del descongelado y el porcentaje de daño acrosomal, como criterio de evaluación den-

tro del laboratorio (8, 19).

El daño acrosomal puede ser medido por medio del microscopio óptico usando técnicas especiales de tinción, como eosina-nigrosina o giemsa, aunque puede evitarse la tención utilizando el microscopio de contraste de fases o el electrónico (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 motilidad oscilatoria en espermatozoides viejos o que están muriendo. Se han desarrollado métodos fotoeléctricos 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 los correlacionan con la fertilidad (15).

La motilidad al descongelado también parece ser afectada por el grado de dilución (25). La motilidad parece mantenerse mejor a una dilución de 1:10 y peor a 1:1 o 1:2. Los mejores porcentajes de sobrevivencia espermática (40.4 y 40.8%) fueron obtenidos con diluciones 1:4 y 1:5 en comparación con las diluciones anteriores (1, 27).

Se han hecho trabajos utilizando diferentes ritmos de descongelado, obteniéndose diversos resultados al descongelar pajillas de 0.5 ml. a una temperatura de 37°C por 12-15 seg., en la cual se obtuvo una motilidad de 68.43% y un daño acrosomal de 8.64% (7). En otro estudio se descongelaron pajillas de 0.5 ml. a una temperatura de 35°C por 12 seg. obteniéndose una motilidad de 74.32%, 68.21% y 54.48% a 24, 48 y 72 horas respectivamente (9). Otros investigadores descongelaron pajillas de 0.25 ml. a 75°C por 12 seg. y a 35°C por 30 seg. y encontraron que el descongelado a una temperatura alta dió mejores resultados (17, 25), aunque en condiciones de campo es difícil emplear esta técnica.

La temperatura y el tiempo del congelado y descongelado son parámetros básicos para la adecuada recuperación espermática. Algunos autores que han trabajado con bovinos opinan que como regla general, entre más rápido se congele y descongele el semen se obtiene mayor recuperación espermática (14, 17).

La temperatura de descongelación se puede incrementar para obtener mayor recuperación espermática a 40, 60 o 75°C, pero existe el peligro de exponer a los espermatozoides a una mayor temperatura por tiempo prolongado, lo cual resulta fatal (24).

Existen muy pocas investigaciones en las que se hayan comparado tiempos y temperaturas para la descongelación del semen de chivo, - por lo que en el presente trabajo se pretende determinar qué tanta diferencia existe entre los diferentes ritmos de descongelación.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

El presente estudio se realizó en el Depto. de Reproducción e Inseminación Artificial de la F.M.V.Z. y en el rancho "Cuatro Milpas" (C.N.E.I.Z.) de la F.M.V.Z.-U.N.A.M. Se utilizaron 4 sementales caprinos de las siguientes razas: 2 Anglo-Nubia, 1 Alpino Francés y 1 Saanen. La colección del semen se realizó dos veces por semana durante dos semanas (7, 8), con lo que se obtuvo un total de 16 eyaculados para lo cual se utilizó una vagina artificial de 15 cm. de largo por 5.5 cm. de ancho, que tiene en uno de sus extremos un tubo recolector estéril graduado en mililitros, a una temperatura de 30°-37°C antes de recibir el eyaculado. La vagina artificial tenía una temperatura interna de 42-45°C (15. 24).

Después de recolectar el semen se igualaron las temperaturas del semen y diluyente manteniéndolos en el mismo baño María a 37°C, 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 preserva al semen en mejores condiciones y ayuda a proteger el semen contra el choque frío durante los siguientes minutos (15).

Siempre debe añadirse el diluyente al semen, nunca al revés por que se puede causar un choque a los espermatozoides. Una vez hecha la dilución se mezcló gentilmente y se procedió a analizar.

La evaluación de los eyaculados se realizó tomando en cuenta las siguientes características: 1. Volumen, 2. Motilidad (mov. progresivo), 3. Concentración, 4. Morfología y 5. Daño acrosomal.

El volumen del eyaculado se midió directamente del tubo recolector; el movimiento progresivo se evaluó al poner una gota de semen en un portaobjetos con cubreobjetos precalentados a 37°C y manteniéndolos a esta temperatura con una botella plana de vidrio llena de

agua a 38°C a modo de termoplatina (2), y se observó con el objetivo seco fuerte. El movimiento individual de los espermatozoides debe ser lineal, progresivo y se calcula en porcentaje. Una buena muestra debe tener 70% de espermatozoides con este tipo de movimiento. - El movimiento circular o local es anormal (6. 16).

La concentración espermática o densidad se calcula por el método del Hematocitómetro de Spencer. Este método es el mismo que se utiliza para el conteo de glóbulos rojos. La dilución se efectúa con la pipeta de glóbulos rojos (dilución 1:200) utilizando una solución salina al 3% con formalina para matar a los espermatozoides y poder contarlos sobre la cuadrícula de la cámara de Spencer.

El estudio de morfología, para observar la cantidad de espermatozoides vivos y las anomalías, el semen se mezcla con colorantes y se realiza un frotis; en esta técnica se utilizó la tinción de Giemsa.

Para determinar el daño acrosomal se siguió la técnica descrita por Hancock (16), 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 cubreobjetos, observándose 100 células en microscopio de contraste de fases con el objetivo de inmersión (100x). Se diferenciaron los espermatozoides con margen apical acrosomal normal de aquellos que presentaron alguna alteración en el acrosoma.

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 0.5 ml. (20, 25).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

El diluyente utilizado fue: (28)

Solución Madre

Tris (hydroximetil) aminometano	18.02 g.
D-Glucosa	9.978 g.
Acido cítrico	7.44 g.
Agua bidestilada	500.0 ml.

Solución de trabajo

Solución Madre	35.0 ml.
Yema de huevo	10.0 ml.
Glicerol	3.5 ml.
Agua bidestilada	1.5 ml.
O.E.P. (Orvus-pasta)	0.03 ml.

De la solución madre se tomaron 35 ml. y se añadieron 10 ml. de yema de huevo, 3.5 ml. de glicerol, 1.5 ml. de agua bidestilada y 0.03 ml. de O.E.P. (Orvus-pasta). Se procedió a llenar las pajillas de 0.05 ml. conteniendo 100×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva, sellándolas con alcohol polivinílico. Es importante dejar un pequeño espacio de aire dentro de la pajilla antes de sellarla, este espacio se hizo por desplazamiento de volumen introduciendo la punta de un peine especial dentro de la pajilla (24).

Se procedió a enfriarlas en el refrigerador en posición horizontal envueltas en una toalla de papel y se mantuvieron en un período de equilibrio de 1.5 hr. a 5°C (10). Transcurrido este período, las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido a 4.5 cm. sobre el nivel del nitrógeno, durante 10 min. Ya congeladas las pajillas, se introdujeron al termo con nitrógeno líquido (-196°C) y se almacenaron aproximadamente 30 días.

Las pajillas se descongelaron a dos diferentes tiempos y temperaturas. El primer grupo a 37°C por 15 seg. y el segundo grupo a 55°C por 8 seg. El número total de pajillas descongeladas fue de 144, de las cuales 72 se descongelaron a 37°C por 15 seg. y las otras 72 a 55°C por 8 seg. para poder comparar los diferentes ritmos de descongelación. Se procedió a evaluar el porcentaje de movimiento progresivo espermático y el porcentaje de daño acrosomal; posteriormente se analizaron los resultados por medio de un análisis estadístico no paramétrico empleando la prueba de la mediana y su configuración con la prueba de χ^2 .

R E S U L T A D O S

En el presente trabajo se llegó a la conclusión de que el promedio de movimiento progresivo espermático en el semen descongelado a 37°C por 15 seg. fue mayor que el semen descongelado a 55°C por 8 seg., como se aprecia en el cuadro 1 y 2. Aunque el porcentaje encontrado fue ligeramente superior, no se encontró diferencia significativa estadística importante ($P < 0.05$).

También se encontró que respecto al porcentaje de daño acrosomal, éste fue menor en las pajillas descongeladas a 37°C por 15 seg. que en las pajillas descongeladas a 55°C por 8 seg. ($P < 0.05$), cuadro 2. También se observó que existen diferencias entre razas como se puede ver en el cuadro 1 y 2, por ejemplo el porcentaje de motilidad del semental Saanen fue de 81.25% y 65% antes y después de congelar, en comparación con el semental Anglo-Nubia que fue de 77 y 62% antes y después de congelar respectivamente. Así como también hubo variación entre razas.

Es importante hacer notar que aunque el procedimiento es el mismo para cada semental, siempre existen variaciones; pero el tomar en cuenta la diferencia de razas es de importancia para la elaboración de programas Zootécnicos y de Inseminación Artificial (13).

CUADRO 1

PROMEDIO DE MOTILIDAD Y DAÑO ACROSOMAL DE SEMEN DE CUATRO MACHOS CAPRINOS DESCONGELADOS EN
PAJILLAS DE 0.5 ml. A 37°C POR 12 SEGUNDOS

Chivo	Número de eyaculados	No. de pajillas descongeladas	% Mot. antes de congelar	% Daño acrosomal antes de congelar	% Mot. después de congelar	% Daño acrosomal después de congelar
Saanen 1	4	18	81.25	2.5	65	8.75
Anglo-Nubio 2	4	18	77.5	4.75	62.5	10.75
Anglo-Nubio 3	4	18	80	5.25	67.5	7.75
Alpino 4	4	18	81	5	56.25	10
Total	16	72	79.9	4.37	62.81	9.31

CUADRO 2

PROMEDIO DE MOTILIDAD Y DAÑO ACROSOMAL DEL SEMEN DE CUATRO MACHOS CAPRINOS DESCONGELADOS EN
PAJILLAS DE 0.5 ml. A 37°C POR 12 SEGUNDOS

Chivo	Número de eyaculados	No. de pajillas descongeladas	% Mot. antes de congelar	% Daño acrosomal antes de congelar	% Mot. después de congelar	% Daño acrosomal después de congelar
Anglo-Nubio 1	4	18	77.5	3.5	56.60	13.75
Anglo-Nubio 2	4	18	77.5	5.5	66.25	9
Alpino 3	4	18	81.25	3.75	53.25	15
Saanen 4	4	18	83.75	4.75	58.75	11.75
Total	16	72	80	4.37	58.68	12.3

D I S C U S I O N

Cuando el semen es sometido a un proceso de dilución y enfriamiento o congelación existe una disminución en la motilidad espermática que puede ser debido a que existe una posible pérdida o alteración de los componentes celulares y a un trastorno en el intercambio iónico, involucrando al potasio y quizás a los fosfatos que se observan en la dilución del semen (1).

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; ésta 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 (5, 12).

En un trabajo en el que se descongeló semen de chivo en pajillas de 0.5 ml. a 37°C por 12 a 15 seg. se tuvieron mejores resultados con el ritmo de enfriamiento más lento (35°C a 5°C en 2.5 hrs.), con 69.55% de motilidad progresiva y con el más bajo porcentaje de daño acrosomal (6).

El descongelado del semen es un procedimiento crítico, ya que puede ocurrir daño celular tanto al momento de congelar, como al momento de descongelar. No existen parámetros técnicos para detectar y medir el grado de afección debido al congelamiento o descongelamiento por separado. Se debe tener cuidado en la selección de un medio de dilución adecuado para utilizarse dentro de un ritmo de congelación-descongelación (25).

Existe un rango muy amplio en cuanto a los diferentes períodos de equilibrio utilizados, algunos autores prefieren usar rangos que

duran varias horas en período de equilibrio (8), así como otros prefieren períodos de equilibrio más cortos como el de 1.5 hr. a 5°C, - que ha sido utilizado por varios autores con éxito (8, 25).

Debe mantenerse la temperatura constante a 5°C durante todo el período 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 fatales para los espermatozoides (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; pero el congelamiento inadecuado puede dañar el acrosoma y las membranas celulares (26).

De acuerdo con los resultados obtenidos no se encontró diferencia estadística entre los dos diferentes ritmos de descongelación, - aún cuando existe variación de opiniones respecto a algunos autores que mencionan que a medida que se aumenta la temperatura de descongelación, aumenta el porcentaje de motilidad espermática y el porcentaje de acrosomas normales en trabajos con semen bovino (14, 17).

Se han hecho trabajos donde se obtienen resultados superiores con las descongelaciones rápidas, pero muchas de éstas son a nivel - laboratorio o contando con todo el equipo necesario para facilitar - la descongelación. A nivel de campo deben considerarse las pequeñas variaciones en el tiempo de descongelación, lo que puede ocasionar - daños irreversibles en la sobrevivencia espermática.

Investigadores que han trabajado con semen bovino no obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de movimiento progresivo y de daño acrosomal cuando descongelaron a 35°C y a 75°C, lo cual es contrario a los reportes de otros investigadores que obtuvieron mayores porcentajes de motilidad progresiva al descongelar a 35°C que a 50°C (15, 17).

El procesamiento del semen de chivo requiere generalmente de diluciones muy bajas como 1:4, ya que se requiere de envasar en un pequeño volumen una gran cantidad de espermatozoides. Esto origina que los ingredientes presentes en el diluyente disminuyan en su concentración después de diluir y por lo mismo, al momento de la congelación. 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, 15).

Es necesario tomar en cuenta que la determinación del daño acrosomal es sumamente importante, pues no está relacionado con la motilidad de los espermatozoides, lo cuales pueden tener buena motilidad y tener dañado el acrosoma. El daño acrosomal varía con el método de congelamiento y descongelamiento. El borde apical del acrosoma del espermatozoide del toro, carnero y chivo, se deterioran con la edad (15), por lo que se puede confundir si el daño fue causado por el congelamiento o descongelamiento, por tal razón se debe analizar el daño acrosomal antes del congelamiento y después del descongelamiento para saber cuál fue el daño real producido.

Se puede concluir que bajo las condiciones en que se realizó este experimento, ambos ritmos de descongelación pueden ser utilizados pero a nivel de campo, se recomienda la descongelación a 37°C por 12 a 15 seg. dada la facilidad que representa el obtener y mantener esta temperatura constante. Además que los pequeños errores que en cuanto a tiempo se pudieran tener al descongelar a 37°C, no son fatales para los espermatozoides, mientras que a mayores temperaturas el daño puede ser irreversible.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. Aandal, J1, Lyngset, O. and Fossum, K.: Toxic effect of lysolecithin on sperm. Nord. Vet. Med., 17: 633-639 (1965).
2. Angulo M. R.: Determinación de la temperatura y tiempo óptimo para la descongelación del semen de ovino, Tesis de licenciatura F. M.V.Z., U.N.A.M., México, D. F., 1988.
3. Bustamante, C. G.: Acción del sulfóxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación, Tesis de maestría. F.M.V.Z., U.N.A.M. 1980.
4. Corteel, J. M.: Viability of Spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma. Ann Biol. Anim. Bioch. Biophys, 14: 741-745 (1974).
5. Deka, B. C. and Rao, A. R.: Effect of cooling time on quality of frozen goat semen. Animal Breeding Abstracts1, 56 (7):598 (1988)
6. Deka, B. C. and 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).
7. Deka, B. C. and Rao, A. R.: Effect of glycerol level in tris based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. Indian Vet. J., 26-2: 23 -238 (1984).
8. Deka, B. C. and Rao, A. R.: Effect of extenders on freezability of buck semen. Indian J. Anim. Sci., 55 12): 1035-1040 (1985).
9. Deka, B. C. and Rao, A. R.: Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buck semen. Indian Vet. J., 62: 414-417 (1985).
10. Deka, B. C. and Rao, A. R.: Motility of buck spermatozoa during preservation at 5°C with and without seminal plasma. Indian Vet. J., 63: 169-170 (1986).

11. Fiser, P. S. and Fairful, R. W.: The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram frozen in straws. Ann. Reach. Centre. Cryobiology, 21:5420551 (1984).
12. Galina, C., Slatiel, A., Valencia, J., Becerril, J., B. Camante, G. Calderón, A., Duchateau, A., Fernández, S., Olguín, A., Páramo, R. y Zarco, L.: Reproducción de animales domésticos, Ed. Limusa, S. A. de C. V. México 1, D. F., 1986.
13. Gomes, W. R.: Reproduction in Domestic Animals. Academic Press. N. Y., 1977.
14. Graham, E. F.: Fundamentals of the preservation of spermatozoa in: The integrity of frozen spermatozoa. National Academy of Sciences, Washington, D. C., 1978.
15. Hafez, E. S. E.: Reproduction in farm animals, 3th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1975.
16. Hancock, J. L.: The spermatozoa of sterile bulls. J. Exptl. Biol. 30: 50 (1953).
17. Jondet, R.: The rapid freezing of bull semen conditioned in straws, Vth Intl. Congr. Anim. Reprod. Ai, Trento, 4: 463-468 (1964).
18. Mc Donald, L. E.: Reproducción y endocrinología veterinaria, 2a. ed. Interamericana, México 4, D. F., 1978.
19. Memon, M. A., Bretzlaff, K. N. and Ott, R. S.: Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa, Am J. Vet. Res., 46: 473-475 (1985).
20. Mushtaq, A., Katherine, N. B., 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).
21. O'Shea, T. and Wales, R. G.: Effect of casein lecithin, glycerol and storage at 5°C on diluted ram and bull semen. Aust. J. Biol. Sci., 19: 871-882 (1966).

22. Ritar, A. J. and Salomon, S.: Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the angora goat. Aust. J. Biol. Sci., 36: 49-59 (1983).
23. Roy, A.: Egg yolk coagulating enzymes 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 goats. Butterworths Pty Limited, Australia, 2087.
25. Salamon, S. and Ritar, A. J.: Deep freezing of angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 35: 295-303 (1982).
26. Sorensen, A. M.: Reproducción Animal: Principios y prácticas, 1ª ed. Ed. Mc. Graw Hill, México, D. F. (1986)
27. Tewari, S. B., Sharma, R. P. and Roy, A.: Effects of dilution on the preservation of ram and goat spermatozoa viability. Indian J. Vet. Sci., 38: 567-573 (1968)
28. Velasco Pérez, J.: Die bedeutung verschiebener samen vorbehandlung fur die tiefgefrier konservierung von ziegenbuckesperma (Importance of different procedures of the buck semen before freezing for the freeze preservation) Tesis de doctorado, Tierarztliche Hochschule Hannover, Hannover. 1985.
29. Wayne W., Daniel: Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud, 1ª ed. limusa, México, D. F. 1982.