



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Efecto del Método de Glicerolación y dos Técnicas de Descongelación Sobre la Motilidad Progresiva y la Integridad Acrosomal del Espermatozoide de Carnero

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ERNESTO URREA JIMENEZ

ASESORES:

M. V. Z. Mc. JOAQUIN BECERRIL A.
 M. V. Z. Mc. CARLOS SOSA FERREIRA
 M. V. Z. Mc. ALVARO LOPEZ PEREZ



México, D. F.



1989



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.

CONTENIDO

	página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
REVISION DE LITERATURA	6
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS	16
DISCUSION	18
CUADROS	20
LITERATURA CITADA	26

EFFECTO DEL METODO DE GLICEROLACION Y DOS TECNICAS DE
DESCONGELACION SOBRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA Y LA
INTEGRIDAD ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE
DE CARNERO

ERNESTO URREA JIMENEZ

ASESORES: MVZ. Mc. JOAQUIN BECERRIL A., MVZ. Mc. CARLOS SOSA FE-
RREYRA, MVZ. Mc. ALVARO LOPEZ PEREZ.

R E S U M E N

Un experimento factorial 2×2 fue llevado a cabo para determinar el efecto de 2 métodos de adición del glicerol con semen refrigerado y dos técnicas de descongelación sobre la motilidad progresiva y la integridad acrosomal del espermatozoide de carnero. El semen se recolectó con vagina artificial de cinco sementales de la raza Merino Australiano y se diluyó con la fracción no glicerolada del diluyente compuesto por tris-ácido cítrico-fructuosa-yema. Cada eyaculado después de haber registrado la temperatura de 5 C fue dividido en dos partes iguales: agregando a la primera el diluyente glicerolado en una sola etapa y en tres con intervalos de 15 minutos a la segunda. Se envasó el semen en pajillas francesas de 0.5 ml y se congeló en vapor de nitrógeno líquido. La descongelación se realizó sumergiendo las paji-

llas de cada tratamiento en agua a 75 C por 12 segundos y a 35 C durante 30 segundos, se evaluó con contraste de fase el porcentaje de motilidad progresiva al descongelado (MPD) y el porcentaje de acrosomas intactos (PAI), cuantificado en 100 células fijadas en solución Hancock las de borde apical normal, ausente o deteriorado. Las técnicas de descongelación resultaron con significancia estadística ($P < 0.01$) sobre ambas variables, no así el método de glicerolación. La técnica de 75 C por 12 segundos fue la que arrojó mejores resultados de MPD ($24.5 \pm .7$) y PAI (47.3 ± 1.2) contra ($19.6 \pm .8$ y 35.7 ± 1.4) obtenidos con la segunda técnica de descongelación.

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

México es un país que cuenta con grandes áreas de terreno adecuadas para la cría y desarrollo de los ovinos pero por problemas económicos, políticos, sociales y técnicos, la ovinocultura no ha acompañado las tendencias de producción de las demás especies que integran el subsector pecuario. La baja productividad de esta especie y la alta demanda de sus productos exige recurrir a la importación, para cubrir las necesidades nutricionales de un México cada día más densamente poblado, ocasionando así la fuga de divisas de nuestro país.

A groso modo, el 95% del rebaño nacional está constituido por animales denominados criollos que tienen como común denominador bajos rendimientos en sus índices productivos, sin embargo existe un 5% de animales de razas definidas que bien podrían utilizarse como base en los programas de mejoramiento genético incrementando así la producción de carne y lana. (4,27,35).

La inseminación artificial (IA) mediante la utilización de sementales de alto potencial genético y semen congelado de buena calidad, es una alternativa para acelerar el progreso genético de estos animales. La posibilidad de utilizarla se ha incrementado sustancialmente mediante el acceso a la técnica de congelación de semen ovino (21,24).

Al aplicar esta técnica algunos investigadores han obtenido porcentajes de fertilidad similares, inseminando ovejas con semen fresco o congelado (3,6). Sin embargo en la mayoría de los trabajos publicados, se comunican bajos porcentajes de parición al utilizar semen congelado. (18,40,42).

El poco éxito obtenido en estas investigaciones, se atribuye a causas fundamentales como:

- a) Fallas en el transporte espermático en el tracto reproductivo de la hembra. (22).
- b) La dificultad anatómica que representa el cervix de la oveja para realizar una inseminación artificial intrauterina (10.17).
- c) La reducida fertilidad, por el deterioro que sufre el espermatozoide de carnero al ser sometido al proceso de congelación y descongelación del semen, tal como lo demostraron Watson y Martin (43).

Estos mismos investigadores encontraron que este daño es mayor que el presentado por el espermatozoide de toro al ser sometido al mismo proceso.

Se ha encontrado que los componentes del diluyente, así como la metodología empleada en el proceso de congelación y descongelación del semen, determinan el grado de daño acrosomal del espermatozoide de carnero (34,39,43).

El propósito de este trabajo, fue evaluar el efecto del método de adición del glicerol y dos técnicas de descongelación sobre la motilidad progresiva y la integridad acrosomal del semen de carnero.

REVISION DE LITERATURA

METODO DE GLICEROLACION

Uno de los aspectos importantes de la metodología sobre congelación de semen, es el método de glicerolación. Los experimentos hechos al respecto, se basan en variables como la fertilidad y la motilidad progresiva para determinar el efecto del método de adición del glicerol, pero no en la integridad acrosomal (11,14, 23). Foote (14), investigando el efecto que pudiera tener este método sobre la motilidad y fertilidad del espermatozoide de toro, no obtuvo resultados significativos al añadir el glicerol en una o en cuatro etapas con intervalos de 15 minutos y empleando citrato-glicerol-yema como diluyente. Resultados similares obtuvieron Entwistle y Martin (11) trabajando con semen de carnero y agregando este agente crioprotector en una sola fracción a una primera parte de semen y en tres a una segunda parte, incrementando la concentración de glicerol requerido, en un periodo de 20 minutos. Otros resultados demuestran, que se obtiene buena recuperación espermática del semen de carnero, ya sea adicionando el glicerol en una etapa de 30 a 35 C ó realizando adiciones múltiples a 5 C (40).

En contraste con estos métodos, otros autores indican que el agregar glicerol al semen en una fracción produce un efecto perjudicial en la célula espermática por lo cual recomiendan añadirlo gradualmente (6,12,26,28,34).

El glicerol es el crioprotector más frecuentemente utilizado para reducir el daño que las técnicas de congelación y descongelación ejercen sobre la célula espermática (26). Fiser y Fairfull (12) sostienen que el glicerol provee criopreservación al espermatozoide debido a sus propiedades coligativas con lo que minimiza la formación de cristales de hielo, al incrementar el intervalo en que el agua sale de la célula espermática, durante el proceso de congelación. Estos autores indican que a través del enfriamiento lento, las células espermáticas mueren por haber estado expuestas a una elevada concentración y precipitación de solutos, cambios en el pH y a la deshidratación.

TENICAS DE DESCONGELACION

La mayoría de las investigaciones sobre los efectos de la temperatura y los tiempos de descongelación, enfatizan fuertemente la necesidad de descongelar el semen rápidamente para maximizar la integridad celular. La importancia de la descongelación rápida, es verificada por la correlación positiva de la técnica de descongelación con el mantenimiento acrosomal, motilidad progresiva y capacidad de fertilización de la célula espermática (1,2,3,9,24,31,32,33,39,44).

Las combinaciones de temperatura y tiempos de descongelación, determinan una velocidad de descongelación y una temperatura final

del semen pos-descongelación e influyen fuertemente sobre la recuperación espermática del mismo. La geometría de las pajillas, determina que la relación superficie/volumen sea elevada y por lo tanto el semen en el interior de la pajilla, responda rápidamente a los cambios térmicos del medio, por tal motivo el semen envasado en pajillas, se congela y descongela en forma uniforme y sufre menos daño que con otros tipos de envase (31).

Aamdal y Andersen (1), obtuvieron menor porcentaje de espermatozoides muertos (teñidos) descongelando el semen a una temperatura de 75 C por 12 segundos que a 35 C durante 30 segundos. Andersen et al. (3) obtuvieron buenos resultados de fertilidad (45,57,89% de preñez) con semen envasado en pajillas y descongelado a 75 C por 8.5 segundos. Lillo (24), también publica buenos resultados de fertilidad con semen descongelado a 70 C durante 8 segundos. Tasserón et al. (39) establecen que la temperatura de descongelación 70 C durante 15 segundos, es más benéfica para la integridad acrosomal del espermatozoide de carnero que las combinaciones de 60 C-20 seg., 50 C-26 seg. y 37 C por 45-60 segundos. De Abrew et al. (9), con semen bovino obtuvieron mayor motilidad progresiva con temperaturas de descongelación de 35 C contra 5 C.

Sin embargo no encontraron diferencias con 35 C y 75 C. Esos resultados son similares a los obtenidos por Almquist (2), quien encontró mayores resultados de motilidad progresiva e inte-

gridad acrosomal cuando descongeló semen a 35 C durante 10, 20 y 80 segundos, que cuando lo hizo a 5 C durante 50 segundos. Forde y Gravir (15), obtuvieron mayor fertilidad con semen descongelado a 35 C que a 10 C.

Chandler et al. (8) en un experimento sobre temperatura y tiempo óptimo de descongelación de semen bovino destacan la importancia de que la técnica de descongelación utilizada debe proporcionar una temperatura final del semen alrededor de los 32 C, para que sea cercana a la temperatura corporal, y que subsecuentemente se deberán tomar grandes precauciones de protección para evitar exponer el semen a cambios bruscos de temperatura.

DAÑO ACROSOMAL

De las investigaciones hechas al respecto se publica que el cambio brusco de temperatura, altera la permeabilidad de la membrana plasmática principalmente para el ion calcio, ocasionando que éste se acumule y aumente el daño celular al interferir con la reacción acrosomal (30). Quinn et al. (29), valiéndose del microscopio electrónico, observaron hinchazón del acrosoma con reducción en la densidad del material contenido dentro de la membrana acrosomal del espermatozoide de carnero, remarcando que este efecto, fue más pronunciado por la congelación que por el shock por frío. Tasseron et al. (39), empleando la tinción de Giemsa,

detectaron por medio del microscopio de luz y microscopio electrónico 40 y 70% de daño acrosomal respectivamente y destacan que alrededor del 50% del daño es acumulado durante la dilución y enfriamiento del semen, por lo que sugieren la necesidad de mejorar los diluyentes. Estos autores coinciden con otros (5,19) al señalar que se registra un daño acumulativo sobre el capuchón acrosomal en las diferentes etapas de procesamiento del semen. Los resultados obtenidos por Headley (19), también concuerdan con estos señalamientos; al estudiar el daño acrosomal post-descongelación del semen de varias especies animales, encontrando muy elevado el grado de daño acrosomal del espermatozoide de carnero.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro Nacional de Genética y Reproducción Animal, dependiente de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, localizado en Ajuchitlán, Municipio de Colón, Estado de Querétaro, a 20 50' de latitud norte y 100 03' longitud oeste; su altitud es de 1,800 metros sobre el nivel del mar. El clima predominante en la región, es el templado-semiseco con una media anual de temperatura y precipitación pluvial de 17.3 C y 568.6 mm de Hg respectivamente.

Se utilizaron cinco sementales de la raza Merino-Australiano sexualmente maduros y entrenados al servicio de la vagina artificial. Cada uno de estos animales, fue colectado en cinco ocasiones para completar un total de 25 eyaculados. La rutina de recolección abarcó un período de tres semanas con intervalos de tres días en las colecciones. Los eyaculados fueron evaluados inmediatamente después de colectados, registrando el volumen directamente del tubo de colección expresado en mililitros. Se evaluó la motilidad progresiva, colocando una pequeña gota de semen mezclado con diluyente no glicerolado a 35 C, entre porta y cubre objetos, observando la muestra en un microscopio de contraste de fase con lente de 400x, el resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (37). La concentración

(Información de la estación climatológica base del Municipio de Colón, Qro.).

espermática se determinó por el método del hematocitómetro y se expresó en millones de espermatozoides por mililitro, de acuerdo a la técnica descrita por López y Valencia (25).

Con los datos obtenidos, se calculó el total de espermatozoides móviles en el eyaculado y la cantidad de diluyente requerido para obtener dosis de 30×10^6 células espermáticas por pajilla.

El diluyente seleccionado (13) tuvo la siguiente composición:

Tris	3.028 gr
Acido Cítrico Monohidratado	1.675 gr
Fructuosa	1.250 gr
Agua Bidestilada c.b.p.	100 ml
Yema de huevo	20 ml
Glicerol	12 ml
Penicilina	100,000 unidades
Estreptomicina	100,000 microgramos

Los carneros asignados al trabajo en pruebas previas de selección produjeron eyaculados con un mínimo de 70% en motilidad progresiva inicial, concentración espermática de 3500×10^6 , total de anomalías por debajo del 15% (10) y una buena recuperación espermática al descongelado.

PROCESAMIENTO DE SEMEN

Inmediatamente después de recolectar el semen se colocó en baño maría a 35 C, se registró el volumen, se evaluó la motilidad progresiva, se obtuvo la concentración espermática y se diluyó el semen en la proporción 1:1 con la fracción no glicerolada del diluyente (20) esto en un lapso no mayor de 5 minutos.

Posterior a la dilución primaria, los tubos de recolección se colocaron en vasos de precipitado con agua a la misma temperatura (35 C) y fueron introducidos en un cuarto de refrigeración para enfriar el semen hasta 5 C, temperatura alcanzada en un periodo de 2 horas. Completando la dilución no glicerolada, cada eyaculado fue dividido en dos partes iguales, a la primera se le agregó el diluyente glicerolado a 5 C en una sola etapa y en tres con intervalos de 15 minutos a la segunda (14). Las muestras tuvieron un equilibrio de 4 horas a 5 C (36); trascurrido este tiempo, se envasaron 10 pajillas francesas con el semen de cada tratamiento por medio de una máquina de llenado y sellado automático.* Posteriormente se sometió el semen a congelación en vapor de nitrógeno líquido (-160 C) a una altura de 5 centímetros sobre el nivel del mismo durante 10 minutos sumergiendo las pajillas inmediatamente después en el nitrógeno líquido donde quedaron almacenadas, para esto se utilizó un tanque de congelación con control de temperatura y tiempo de congelación modelo A-9000 (41).**

* MRS de la Compañía Instruments de Medicine Veterinaire (I.M.V. B.P. 76,61300. L'Aigle, Francia).

** MVE (Minnesota Valley Engineering)

El semen de cada tratamiento se descongeló sumergiendo las pajillas en agua a dos temperaturas: 75 C durante 12 segundos y 35 C por 30 segundos. Fue estimada la motilidad progresiva como porcentaje del 0 al 100 por dos técnicos entrenados y evaluada la integridad acrosomal con contraste de fase y lente de inmersión (1000 x) observando entre porta y cubre objetos una muestra de una gota de semen previamente fijada en solución Hancock y cuantificando en 100 células las de borde apical normal, deforme o ausente (5).

Las variables evaluadas fueron motilidad progresiva e integridad acrosomal del semen descongelado a dos temperaturas y dos tiempos de descongelación.

El arreglo de los tratamientos fue un factorial con un diseño totalmente al azar. Los datos obtenidos se sometieron al análisis de varianza (38) bajo el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = M + C_i + T_j + G_k + CT_{ij} + CG_{ik} + CTG_{ijk} + E_{ijkl}$$

- Y_{ijkl} = Esima observación
 M = Efecto media general
 C_i = Efecto del i=esimo carnero ($i=1 \dots 5$)
 T_j = Efecto de j=esima temperatura ($j= 1,2$)
 G_k = Esimo método de glicerolación ($k=1,2$)
 CT_{ij} = Efecto de la interacción C x T
 CG_{ik} = Efecto de la interacción C x G

TGjk = Efecto de la interacción T x G
CTGijk = Efecto de las interacciones C x T x G
Eijkl = Efecto del error aleatorio asociado a la ijkl
ésima observación.

RESULTADOS

El análisis de varianza nos muestra como la técnica de descongelación, tiene un efecto altamente significativo ($P < .01$) sobre la motilidad progresiva e integridad acrosomal del semen descongelado, no así el método de glicerolación, ni las interacciones en forma doble y triple (cuadros 1,2).

Las técnicas de descongelación analizadas: 75 C por 12 segundos y 35 C durante 30 segundos, resultaron con significancia estadística sobre las mismas variables, siendo la primer técnica con la que se obtuvo una menor variación 24.5 ± 7.57 y 47.3 ± 12.2 de motilidad progresiva al descongelado (MPD) y porcentaje de acrosomas intactos (PAI); contra 19.6 ± 8.2 y 35.7 ± 14.7 , resultados obtenidos con la segunda (cuadros 3,4). Ejemplo de este comportamiento del semen son los resultados obtenidos por Aamdal y Andersen (1), al comparar tres técnicas de descongelación del semen de carnero congelado en pajillas: 75 C-12 segundos, 35 C-30 segundos y 35 C-15 segundos, reportando mejores resultados de motilidad con la primera y ninguna diferencia entre la segunda y tercer técnica. Estos mismos autores subsecuentemente utilizaron el semen descongelado y obtuvieron 61-62.5% de preñez con 16 ovejas inseminadas. Otros investigadores (44) con semen bovino reportan porcentajes de 34, 35, 36 y 38 para motilidad; 62, 68, 69 y 72 de integridad acrosomal con semen

DISCUSION

Las diferencias registradas en motilidad progresiva y porcentaje de acrosomas intactos son debidas a los caracteres individuales de los machos (cuadros 1,2), resultados que coinciden con los de López (25). Otros autores (36), analizaron la motilidad progresiva del semen descongelado de 4 carneros, obteniendo resultados entre el 10% y 40%, atribuyendo las diferencias a la congelabilidad del semen de cada carnero. Salsbury et al. (34), señala que son las características individuales de los toros que producen el semen, la principal fuente de variación en todos los experimentos de semen congelado.

El haber encontrado mejores resultados de nuestras variables con la segunda técnica de descongelación, obedece a que las descongelaciones rápidas benefician la recuperación espermática y minimizan el daño a la integridad celular del espermatozoide de carnero (cuadros 3,4). Sin embargo, dados los efectos adversos que tienen los cambios bruscos de temperatura sobre la célula espermática y la dificultad para contrarestarlos, es recomendable a un nivel de campo descongelar el semen a una temperatura de 35 C por 30 segundos (1,2,9).

Parece ser que no existen reportes acerca del efecto del método de adición del glicerol sobre la integridad acrosomal del semen, pero sí sobre fertilidad y porcentaje de motilidad progresiva

(11,14). Sin embargo, en este trabajo no se obtuvo ninguna ventaja sobre nuestras variables, con añadir la fracción glicerolada del diluyente en una o tres etapas con intervalos de 15 minutos y a una temperatura de 5 C (cuadros 5,6). Algunos autores (23,40), señalan que se obtienen buenos porcentajes de recuperación espermática del semen de carnero ya sea que se adicione el glicerol con el diluyente en una sola etapa a 30 C-35 C, o se haga en adiciones múltiples a una temperatura de 5 C.

CUADRO 1

ANALISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD PROGRESIVA
DEL SEMEN DE CARNERO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F	PROBABILIDAD DE F
Efecto Principal	1584.001	6			
Carnero (C)	953.502	4	238.325	4.22	.0000 **
Temperatura					
Descong. (T)	600.251	1	600.251	10.62	.0000 **
Método de Glicerolación (F)	30.250	1	30.250	.54	.6004 NS
Interacciones Dobles	419.250	9			
C x T	213.500	4	53.375	.94	.4741 NS
C x F	133.500	4	33.375	.59	.8451 NS
T x F	72.250	1	72.250	1.28	.2018 NS
Interacción Triple	231.500	4			
C x T x F	231.500	4	57.875	1.02	.3878 NS
Error	4520.001	80	56.500		
Total:	6754.753	99			

** P < .01

NS No significativo

CUADRO 2

ANALISIS DE VARIANZA PARA INTEGRIDAD ACROSOMAL
DEL ESPERMATOZOIDE DE CARNERO

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	F	PROBABILIDAD DE F
Efecto					
Principal	8772.244	6			
Carnero	5296.646	4	1324.161	9.32	.0000 **
Temperatura					
Descong. (T)	3387.237	1	3387.237	.2385	.0000 **
Método de Glicerolación (F)	88.357	1	88.357	.62	.5430 NS
Interacciones					
Dobles	1001.160	9			
C x T	312.961	4	78.240	.55	.8751 NS
C x F	659.037	4	164.759	1.16	.2595 NS
T x F	29.158	1	29.158	.21	.8194 NS
Interacción Triple	199.838	4			
C x T x F	199.838	4	49.959	.35	.9704 NS
Error	11361.602	80	142.020		
Total:	21334.844	99			

** P < .01

NS No significativo

CUADRO 3

PORCENTAJES DE MOTILIDAD PROGRESIVA PARA
TEMPERATURAS DE DESCONGELACION
DEL SEMEN DE CARNERO

TEMPERATURA	PROMEDIO	DESVIACION STANDAR
75 C - 12 Seg.	24.5	7.57
35 C - 30 Seg.	19.6	8.25

** PO. < .01

CUADRO 4**PORCENTAJES DE INTEGRIDAD ACROSOMAL PARA
TEMPERATURAS DE DESCONGELACION DEL
SEMEN DE CARNERO**

TEMPERATURA	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
75 C - 12 Seg.	47.36	12.24
35 C + 30 Seg.	35.72	14.7

**** P.O. < .01**

CUADRO 5
PORCENTAJES DE MOTILIDAD PROGRESIVA PARA
METODOS DE GLICEROLACION PARA
SEMEN DE CARNERO

METODO DE GLICEROLACION	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
1 Fracción	21.5	8.09
3 Fracciones	22.6	8.46
NS No Significativo		

CUADRO 6
PORCENTAJES DE INTEGRIDAD ACROSOMAL PARA
METODO DE GLICEROLACION DEL
ESPERMATOZOIDE DE CARNERO

METODO DE GLICEROLACION	PROMEDIO	DESVIACION ESTANDAR
1 Fracción	40.6	14.69
3 Fracciones	42.8	14.8

NS No Significativo

LITERATURA CITADA

1. Aamdal, J. and Andersen, K.: Freezing of ram semen in straws. 6th Cong. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif., Paris, (1968) 2: 977-980.
2. Almqvist, J.O.: Effect of cold shock after thawing on acrosomal maintenance and motility of bovine spermatozoa frozen in plastic straws., J. Dairy Sci., 59: 1825 (1976).
3. Andersen, K., Aamdal, J. and Fougner, J.A.: Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. Zuchthyg. 8: 113-118 (1973).
4. Arbiza, S.I.: Estado actual de la Ovinocultura en México. Memorias del Curso sobre Bases de la cría Ovina. FES Cuautitlán, U.N.A.M., Toluca, Edo. de México., 28-35 (1984).
5. Bustamante, G.: Acción del sulfoxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. (1980).
6. Colas, G.: Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. J. Reprod. Fert., 42: 277-285 (1975).
7. Colas, G., and Guerin, Y.: A new method for thawing frozen ram semen. Theriogenology., 16: 623-630 (1981).
8. Chandler, J.E., Nebel, R.L. and Adkinson, R.W.: Optimum Thawing temperature and time for bovine semen processed by three methods and packaged in 1ml ampules. Theriogenology., 19: 209-210 (1983).

9. De abrew, R.M., Berndston, W.E., Smith, R.C. and Pickett, B.W.: Effect post-thaw warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates in french straws. J. Dairy Sci., 62: 1449 (1979).
10. Duran del Campo, A.: Anatomía y Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en ovinos. Editorial Hemisferio Sur., Montevideo, Uruguay (1980).
11. Entwistle, K.W. and Martin, I.C.A.: Effects of composition of diluent, method of addition of glycerol, freezing rate, and storage temperature on the revival of ram spermatozoa after deep-freezing, Aust. J. Biol. Sci., 25: 381-385 (1972).
12. Fiser, P.S. and Fairfull, R.W.: Combined effects of glycerol concentration cooling velocity, and osmolarity of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. Theriogenology., 25: 479-481 (1986).
13. Foote, R.H.: Fertility of bull semen at high extensive rates in Trisbuffered extenders. J. Dairy Sci., 53: 1475 (1970).
14. Foote, R.H.: Influence of extender, extension rate and glycerolation technique on fertility of frozen bull semen. J. Dairy Sci., 53: 1478 (1970).
15. Forde, E. and Gravir, K.: A uniform method of thawing frozen semen. A.B.A., 42 (49) (1974).
16. Fukui, Y.: Effects of different diluents, thawing temperatures and materials of thawing containers on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Japan. J. Anim. Reprod., 25: 160 (1979).
17. Fukui, Y. and Roberts, E.M.: Repeatability of nonsurgical

- intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. Theriogenology., 8: 77-81 (1977).
18. Graham, E.F., Crabo, B.C. and Pace, M.M.: Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci., 47: Suppl. 11, 80-118 (1978).
 19. Headley, P.: Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoa of semen domestic animals. J. Reprod. Fert., 18: 21 (1969).
 20. Honmode, J.: Some observations on fertility of frozen ram semen. Indian Vet. J., 56: 173-177 (1979).
 21. Langford, G.A., Marcus, G.J., Hackett, A.J., Ainsworth, L., Wolynetz, M.S., and Peters, H.F.: A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. Can J. Anim. Sci., 59: 685 (1979).
 22. Lightfoot, R.J. and Salamon, S.: Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa with in the genital tract of the ewe. J. Reprod. Fert., 22: 385-398 (1969).
 23. Lightfoot, R.J. and Salamon, S.: Freezing ram spermatozoa by the pellet method. II. The effects of method of dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at- 5 C prior to freezing on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 22: 1547 (1969).
 24. Lillo, A.: Lambing rates after single insemination of ewes with liquid of deep-frozen semen. 10th Intern. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem., Urbana Champaigne., 3: 373-375 (1984).
 25. López, P.G. y Valencia, Z.M.: Técnica descriptiva de la colección, evaluación y congelación de semen de carneros pelibuey.

7o. Congreso Nacional de Buiatría, Veracruz, Méx. (1982).

26. Ott, S.R. and Memon, A.M.: Sheep and goat manual. Society for theriogenology., 29-30 (1980).
27. Pérez, I.A.: Situación actual de la ovinocultura en México. Memorias del Curso Aspectos de Producción Ovina. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. México, D.F. 32-35 (1981).
28. Pickett, B.W., and Berndston, W.E.: Principles and techniques of freezing spermatozoa and Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of cattle. Ed. Salisbury, Van Demark, Lodge, 2nd. Ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, (1978).
29. Quinn, P.J., White, I.G. and Cleland, K.W.: Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. J. Reprod. Fert., 18: 209-220 (1969).
30. Robertson, L. and Watson, P.F.: Calcium transport in diluent or cooled ram semen. J. Reprod. Fert., 77: 177 (1986).
31. Robbins, K., Gerber, L.E. and Saacke, R.G.: Influence of thaw rate on maintenance of the mal cap. J. Anim. Sci., 35: (1): 253 (1972).
32. Robbins, R.K., Saacke, R.G. and Chamdler, P.T.: Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. J. Anim. Sci., 42 (1): 145 (1976).
33. Saacke, R.G. and White, J.M.: Acrosomal cap maintenance and fertility of frozen bovine semen. J. Anim. Sci., 35 (1): 253 (1972).

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

34. Salisbury, G.W., VanDemark, N.L. and Lodge, J.R.: Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle, 2nd. Ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, (1978).
35. Santos, I.A.: Estado actual de la ovinocultura en México, perspectivas. Memorias del Curso Bases de la Cría Ovina. Toluca, México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 36-43 (1984).
36. Shani, K.L. and Roy, A.: A study on the effect of deep-freezing (-79 C) on post-thawing revival of sheep and goat spermatozoa. Indian J. Anim. Sci., 42 (2): 102-105 (1972).
37. Sorensen, A.M.: Animal Reproduction. Principales and Practices. Ed. Mc. Graw-Hill Inc., (1979).
38. Steel, R.G. and Torrie, J.H.: Principles and Procedures of Statistic. 2nd Ed. Mc-Graw-Hill Book Company, (1980).
39. Tasseron, F., Amir, D. and Schindler, H.: Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing. J. Reprod. Fert., 51: 461-462 (1977).
40. Visser, D. and Salamon, S.: Fertility of ram spermatozoa frozen in tris based diluent. Aust. J. Biol. Sci., 26: 513-516 (1973).
41. Visser, D.: The effect of freezing method on the survival of ram spermatozoa. S. Afr. J. Anim. Sci., 4: 157-163 (1974).
42. Visser, D.: Recent advances in the deep-freezing preservation of ram semen. S. Afr. J. Anim. Sci., 4: 275-288 (1974).

43. 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).
44. Wiggin, H.B. and Almquist, J.O.: Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws. J. Anim. Sci., 40: 302-305 (1975).