

30
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACION DE DOS DILUYENTES UTILIZADOS PARA
CONGELACION DE SEMEN DE CARNERO EN PELLETS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

ISRAEL BRITO FIGUEROA

**ASESORES: MVZ. MPA. JUAN ALBERTO BALCAZAR SANCHEZ
MVZ. DVM. JAVIER DE JESUS VALENCIA MENDEZ
MVZ. MPA. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA
MVZ. ROSA BERTA ANGULO MEJORADA**



México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

**EVALUACION DE DOS DILUYENTES UTILIZADOS PARA
CONGELACION DE SEMEN DE CARNERO EN PELLETS**

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
Médico Veterinario Zootecnista

Por

ISRAEL BRITO FIGUEROA

**ASESORES: MVZ. MPA. JUAN ALBERTO BALCAZAR SANCHEZ
MVZ. DVM. JAVIER DE JESUS VALENCIA MENDEZ
MVZ. MPA. VICENTE OCTAVIO MEJIA VILLANUEVA
MVZ. ROSA BERTA ANGULO MEJORADA**

México, D.F.
1995

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

ROBERTO BRITO Y ELIAZAR FIGUEROA

Por contar siempre con su apoyo y por enseñarme a no bajar nunca los brazos hasta conseguir el objetivo deseado, y decirles de esta forma que este logro obtenido por mí, fue gracias al sacrificio hecho por ustedes.

A MIS HERMANOS:

JORGE, ANGELICA, ROBERTO Y LUPITA

Porque ser hermanos no solo significa tener la misma sangre, si no por demostrármelo siempre con hechos, aún en los momentos más difíciles.

A MIS SOBRINOS:

TITO, MANUEL, PALOMA, IVAN E ILSE

Por inyectar la alegría de sus casas y de sus abuelos en estos tiempos tan complicados.

A TI CARMEN:

Por tu apoyo y cariño brindado durante el tiempo que hemos compartido juntos.

A LA ESCUELA DE LA VIDA Y AL PADRE TIEMPO:

Factores importantes en la formación de un destino en la vida de cada ser humano.

MUCHAS GRACIAS A TODOS USTEDES.

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES : ALBERTO BALCAZAR, JAVIER VALENCIA, ROSA BERTA ANGULO y OCTAVIO MEJIA: Por su ayuda otorgada en la elaboración y término de esta tesis.

A CHEPO, RAMON, VERONICA y CAROLINA: Por su ayuda durante el trabajo de tesis y por ser tan buenos cuates durante el tiempo que hemos trabajado juntos.

A FERNANDO BORDERAS: Por su ayuda en la realización del análisis estadístico.

A MIS AMIGOS: JORGE, BENJAMIN, MEMO, JOSE LUIS, VERONICA CAMPOS, ISMAEL, EFRAIN, JUAN, ALVARO, MARTIN, ISABEL, CAROLINA, RICARDO, TOÑO, FEDERICO, ANDREA y JUDITH : Por su ayuda prestada durante la carrera pero principalmente por darme su amistad y considerarme entre sus amigos.

AL DR. LUIS ZARCO Y AL DR. ANTONIO ORTIZ : Por las facilidades dadas para la realización de esta tesis.

A TODOS LOS DEMAS INTEGRANTES DEL DEPARTAMENTO DE REPRODUCCION: Mariana Bernal, Adriana Saharrea, Salvador Romo, Joel Hernández, Rosa Páramo, Antonio Porras, Carlos Esquivel, Clara Murcia, Susana Rojas, Carlos Galina, Luis Galicia, Maximino Méndez, Julio Rosas, Miriam Boeta y Juan Zárate.

A LOS INTEGRANTES DEL RANCHO C.E.I.E.F.O.: Por su ayuda y buen trato durante la realización del trabajo con los carneros.

A MIS PAISANOS : Alfredo García y Adan Villalobos por sus consejos al emprender esta aventura.

A MIS CUATEROLES: Alfonso (Cadáver), Joel (Motor), Chencho (Changa), Beto (Panadero), Sergio (Huevo), Miguel (Mojarra), Felipe (Pipa) y Paco (Pato) por los ánimos dados durante la carrera.

Al Lic. GUSTAVO SALINAS: Por su ayuda al inicio de la carrera.

A DIOS : Por permitirme terminar este trabajo.

GRACIAS

A LOS INTEGRANTES DEL RANCHO C.E.I.E.P.O.: Por su ayuda y buen trato durante la realización del trabajo con los carneros.

A MIS PAISANOS : Alfredo García y Adan Villalobos por sus consejos al emprender esta aventura.

A MIS CUATEROLES: Alfonso (Cadáver), Joel (Motor), Chencho (Changa), Beto (Panadero), Sergio (Huevo), Miguel (Mojarra), Felipe (Pipa) y Paco (Pato) por los ánimos dados durante la carrera.

Al Lic. GUSTAVO SALINAS: Por su ayuda al inicio de la carrera.

A DIOS : Por permitirme terminar este trabajo.

GRACIAS

CONTENIDO

Página

RESUMEN	1
I.- INTRODUCCION	2
II.- REVISION DE LITERATURA	5
2.1. COLECCION DEL SEMEN	5
2.2. EVALUACION DEL SEMEN	6
2.2.1. Color y olor del semen	6
2.2.2. Volumen del eyaculado	7
2.2.3. Motilidad del semen	7
2.2.4. Concentración de los espermatozoides	9
2.2.5. Morfología de los espermatozoides	11
2.3. DILUCION DEL SEMEN	11
2.4. CONGELACION DEL SEMEN	15
2.5. DESCONGELACION DEL SEMEN	19
III.- MATERIAL Y METODOS	22
3.1. COLECCION DEL SEMEN	22
3.2. EVALUACION Y DILUCION DEL SEMEN	22
3.3. ELABORACION DE LOS DILUYENTES	24
3.4. ELABORACION DE LOS PELLETS	25
3.5. ANALISIS ESTADISTICO	25
IV.- RESULTADOS	27
V.- DISCUSION	30
VI.- CONCLUSIONES	33
VII.- LITERATURA CITADA	34

RESUMEN

BRITO FIGUEROA ISRAEL. EVALUACION DE DOS DILUYENTES UTILIZADOS PARA CONGELACION DE SEMEN DE CARNERO EN PELLETS.(Bajo la supervisión de: MVZ. MPA. Juan Alberto Balcázar Sánchez, MVZ. DVM. Javier de Jesús Valencia Méndez, MVZ.MPA. Vicente Octavio Mejía Villanueva, y MVZ. Rosa Berta Angulo Mejorada).

Se utilizaron nueve carneros adultos de las razas Suffolk y Rambouillet de los cuales se colectaron 30 eyaculados por medio de la vagina artificial durante la época reproductiva. En cada eyaculado se evaluó: el volumen, la concentración espermática, la motilidad progresiva y la morfología. Cada eyaculado se dividió en dos partes iguales y cada parte se diluyó en un diferente diluyente: A (Tris-glucosa-yema de huevo) y B (Lactosa-yema de huevo), de manera que la dilución final contuviera entre 80-100 millones de espermatozoides en un volumen de 0.1 ml. El método de congelación utilizado fue el de pellets. Para este fin, el semen se congeló colocando 0.1 ml de semen en hielo seco (-79°C). Para la evaluación de la recuperación espermática después de la congelación se utilizaron cinco muestras (pellets) por eyaculado y con cada uno de los diferentes diluyentes (300 pellets en total). Este proceso se realizó colocando individualmente los pellets en viales de cristal, conteniendo cada uno 0.15 ml de solución salina fisiológica, mantenidos a 37°C en baño María durante 15 segundos. Mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento de modelos lineales generales, al evaluar los resultados de recuperación espermática después de la descongelación de los pellets se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre ambos diluyentes, siendo superior la recuperación de la motilidad espermática del semen diluido en el medio lactosa-yema de huevo (45.8 %) que en el medio conteniendo tris-glucosa-yema de huevo (40.2 %). Concluyendo de esta forma que bajo estas condiciones referidas, el diluyente conteniendo Lactosa-yema de huevo es mejor para congelar semen de carnero en pellets.

RESUMEN

BRITO FIGUEROA ISRAEL. EVALUACION DE DOS DILUYENTES UTILIZADOS PARA CONGELACION DE SEMEN DE CARNERO EN PELLETS. (Bajo la supervisión de: MVZ. MPA. Juan Alberto Balcázar Sánchez, MVZ. DVM. Javier de Jesús Valencia Méndez, MVZ.MPA. Vicente Octavio Mejía Villanueva, y MVZ. Rosa Berta Angulo Mejorada).

Se utilizaron nueve carneros adultos de las razas Suffolk y Rambouillet de los cuales se colectaron 30 eyaculados por medio de la vagina artificial durante la época reproductiva. En cada eyaculado se evaluó: el volumen, la concentración espermática, la motilidad progresiva y la morfología. Cada eyaculado se dividió en dos partes iguales y cada parte se diluyó en un diferente diluyente: A (Tris-glucosa-yema de huevo) y B (Lactosa-yema de huevo), de manera que la dilución final contuviera entre 80-100 millones de espermatozoides en un volumen de 0.1 ml. El método de congelación utilizado fue el de pellets. Para este fin, el semen se congeló colocando 0.1 ml de semen en hielo seco (-79°C). Para la evaluación de la recuperación espermática después de la congelación se utilizaron cinco muestras (pellets) por eyaculado y con cada uno de los diferentes diluyentes (300 pellets en total). Este proceso se realizó colocando individualmente los pellets en viales de cristal, conteniendo cada uno 0.15 ml de solución salina fisiológica, mantenidos a 37°C en baño María durante 15 segundos. Mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento de modelos lineales generales, al evaluar los resultados de recuperación espermática después de la descongelación de los pellets se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre ambos diluyentes, siendo superior la recuperación de la motilidad espermática del semen diluido en el medio lactosa-yema de huevo (45.8 %) que en el medio conteniendo tris-glucosa-yema de huevo (40.2 %). Concluyendo de esta forma que bajo estas condiciones referidas, el diluyente conteniendo Lactosa-yema de huevo es mejor para congelar semen de carnero en pellets.

I.- INTRODUCCION.

No siempre es posible contar con un macho de excelente calidad dentro de una explotación ovina, por lo que en ocasiones se tiene que recurrir a un programa de inseminación artificial. La implementación de semen congelado en estos programas ha dado lugar a un gran número de investigaciones para encontrar los métodos de envasamiento, componentes de los diluyentes, tiempos de enfriamiento y congelación óptimos para obtener los mejores porcentajes de fertilidad (Evans y Maxwell, 1990).

Con el desarrollo a gran escala de programas de inseminación en el ganado durante el presente siglo, la necesidad de transportar el semen del lugar de la colección hasta el sitio de la inseminación, y la presentación de celo de un gran número de hembras sobre períodos reducidos y en diferentes épocas del año, requiere la preservación de los espermatozoides bajo condiciones artificiales (Maxwell *et al.* 1984). Además, a veces es necesario contar con una mayor cantidad de semen para programas de sincronización de estros.

La preservación del semen ha sido llevado a cabo utilizando métodos que reducen o detienen el metabolismo del espermatozoide prolongando su vida fértil (Maxwell *et al.* 1984).

En los programas de inseminación artificial, los tipos de presentación más utilizados para la conservación de semen en nitrógeno líquido han sido el método de congelación en pellets y el de pajillas (Evans y Maxwell, 1990).

El método de congelación en pellets sobre hielo seco (-79° C) es considerado un método rápido y tiene además una mejor recuperación de los espermatozoides a la descongelación (Evans y Maxwell, 1990).

Para implementar un programa de inseminación artificial en un rebaño ovino, además del aspecto genético se deben de efectuar una evaluación sistemática de los machos antes de utilizarlos, que contemple un examen clínico general, de enfermedades específicas, así como de libido y de la calidad del semen (Bustamante, 1981a; Evans y Maxwell, 1990).

Una vez que un macho ha calificado de manera satisfactoria en las evaluaciones, se procederá a realizar la colección de semen, el cual antes de ser procesado para su congelación deberá ser diluido.

La dilución del semen se lleva a cabo por razones técnicas y biológicas (Evans y Maxwell, 1990). En cuanto a las razones técnicas para diluir el semen se encuentra la ventaja de poder inseminar mayor número de hembras que por monta natural, ya que el límite normal más bajo para obtener tasas aceptables de concepción inseminando por vía transcervical con semen congelado, es una concentración mínima de 60 millones de espermatozoides móviles en un volumen de 0.05 a 0.20 ml. y de 20 millones de espermatozoides móviles en un volumen de 0.05 a 0.1 ml. para el caso de la inseminación artificial intrauterina por laparoscopia (Evans y Maxwell, 1990).

Estas concentraciones mínimas son importantes, ya que la fertilidad obtenida siguiendo un programa de inseminación artificial con semen congelado-descongelado, está limitada por la incapacidad de los procedimientos de congelación para mantener la capacidad fertilizante del espermatozoide durante su tránsito por el cérvix (Windsor *et al.* 1994), paso por el cual muchos de los espermatozoides son perdidos rápidamente (Hawk, 1983). Esta pérdida disminuye directamente el número de espermatozoides que alcanzan el oviducto para garantizar la fertilización de los ovocitos (Windsor *et al.*, 1994). Con la implementación de la inseminación artificial por laparoscopia, la barrera natural que representaba el cérvix ha sido superada, ya que esta técnica permite el depósito directo del semen dentro del lumen uterino (Armstrong y Evans, 1984; Maxwell y Salamon, 1993), con lo que ha dejado de ser extremadamente limitado el uso comercial del semen congelado en el borrego (Killeen y Caffery, 1982). Además ha fomentado que se retome nuevamente en los últimos años el interés por congelar semen utilizando el método en pellets (Mathur *et al.*, 1989; Mathur *et al.*, 1993; Molinia *et al.*, 1994a y 1994b; Valcarcel *et al.*, 1994; Windsor *et al.*, 1994) y en pajillas (Graham, 1994).

Desde el primer paso hecho por Spallanzani en 1776 en la preservación de espermatozoides de mamífero (Maxwell *et al.*, 1984) se han hecho estudios a través del tiempo, con el fin de mejorar cada vez más esta preservación (Maxwell *et al.*, 1984).

Las pocas mejoras recientes en el incremento de fertilidad atribuibles al desarrollo de diluyentes (Radillo, 1992) fomenta la búsqueda de nuevos componentes y diferentes concentraciones de los ya utilizados. Actualmente se ha empleado con algunas modificaciones para la congelación de semen, el diluyente desarrollado por Salomon y Visser (1972), el cual aparentemente permite alcanzar un alto porcentaje de motilidad al descongelarlo y un mejor índice de concepción.

Sin embargo, existe una gran cantidad de diluyentes que se han utilizado en el pasado para conservar semen en forma de pellets. El diluyente a base de lactosa y yema de huevo (Nagase y Niwa, 1964) se ha utilizado ampliamente para congelar el semen bovino (Nagase y Niwa, 1964), equino (Klug *et al.*, 1977) y suino (Westendorf *et al.*, 1975).

Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue el de comparar el diluyente Tris-glucosa-yema de huevo (A) y el de Lactosa-yema de huevo (B) para la congelación de semen de carnero en forma de pellets.

II.- REVISION DE LITERATURA

2.1.- COLECCION DEL SEMEN.

En ovinos los métodos de colección de semen comúnmente utilizados son la vagina artificial y la electroeyacuación. De los dos métodos, la vagina artificial es el más adecuado para obtener semen, ya que es rápido, limpio y un macho puede colectarse varias veces al día, siendo el eyaculado obtenido de menor volumen pero de mayor concentración espermática (Evans y Maxwell, 1990). Con el método de estimulación eléctrica, el eyaculado presenta un mayor volumen pero una menor concentración espermática, además puede contaminarse fácilmente con orina durante la colección (Randall y Mushtaq, 1980; Evans y Maxwell, 1990) y en algunos casos, los machos pueden no responder a una segunda o tercera colección. Otra desventaja es que la elevada cantidad de plasma seminal obtenida por este método ocasiona una disminución de la resistencia del espermatozoide al choque por frío cuando va a ser congelado y por lo tanto un decremento en la tasa de supervivencia espermática postdescongelación (Randall y Mushtaq, 1980).

La vagina artificial es una imitación de la vagina de la hembra la cual proporciona un estímulo térmico (temperatura) y mecánico (presión) necesarios para producir la eyacuación (Hafez, 1989a; Evans y Maxwell, 1990). La vagina artificial utilizada en los ovinos tiene una medida de 20 x 5.5 cm, está fabricada regularmente de hule o algún otro material sintético, la cual funciona en los carneros a una temperatura de 40 a 45° C (Evans y Maxwell, 1990; Moore y Miller, 1993), lo que se puede controlar mediante la inserción de un termómetro limpio (Evans y Maxwell, 1990).

El tubo colector colocado en uno de los extremos de la vagina debe estar estéril y mantener una temperatura de 30 a 37° C con el fin de evitar el choque por frío de los espermatozoides. Inmediatamente después de colectado el semen debe colocarse en un baño María a 30° C para igualar la temperatura del semen y del diluyente (Evans y Maxwell, 1990).

2.2.- EVALUACION DEL SEMEN.

Esta prueba se hace con el fin de predecir la fertilidad del macho (Bustamante, 1981a). Por eso, una vez colectado el semen por cualquier método, antes de usarlo en un programa de inseminación artificial, se debe determinar cuidadosamente tanto la cantidad como la calidad del eyaculado, ya que ambos aspectos varían individualmente en cada eyaculado (Evans y Maxwell, 1990), dependiendo de algunos factores tales como la edad, época reproductiva, efecto de la temperatura, estado corporal, tamaño de los testículos y la raza (Randall y Mushtaq, 1980).

La cantidad de espermatozoides por eyaculado depende del volumen y de la concentración del semen (Randall y Mushtaq, 1980; Evans y Maxwell, 1990). En la evaluación de la calidad del semen, se valoran las características de motilidad y morfología (Randall y Mushtaq, 1980, Evans y Maxwell, 1990), ya que se recomienda calcular ambas características antes de diluirlo (Evans y Maxwell, 1990). Además hay que tomar en cuenta otras características como son el color, olor y la viscosidad, las cuales se evalúan inmediatamente después de la colección.

El estudio del semen debe ser rápido y eficaz, por lo que las muestras deben colectarse en forma cuidadosa y prepararse posteriormente a fin de que conserven su calidad y fertilidad inicial (Hafez, 1989a).

2.2.1.- Color y olor del semen.

El primer aspecto que se valora inmediatamente después de la colección del semen es el color y se hace en el mismo recipiente en que se colectó (Hafez, 1989a; Evans y Maxwell, 1990). El semen del carnero es de un color blanco lechoso o crema pálido, pero puede variar de un eyaculado a otro, aún siendo del mismo semental (Evans y Maxwell, 1990). Una coloración opaca es indicativa de una elevada concentración de espermatozoides, ya que se ha observado que muestras translúcidas contienen pocos espermatozoides. La presencia de algunos otros colores como el rosáceo o el gris son indicativos de algunas alteraciones como pueden

ser, la presencia de sangre por lesiones en el pene y el prepucio, y otros colores debidos a contaminaciones ó infecciones del sistema reproductor (Hafez, 1989a; Evans y Maxwell, 1990).

Cuando existe orina en el eyaculado se presenta un olor característico a la misma, además de que la coloración es menos intensa, siendo más frecuente encontrarla cuando se utiliza el método de electroeyaculación como método de colección (Hafez, 1989b; Evans y Maxwell, 1990)

2.2.2.- Volumen del eyaculado.

El volumen también se mide directamente en el recipiente de colección, el cual debe estar graduado para facilitar este manejo.

El volumen promedio que se obtiene cuando se utiliza la vagina artificial es de 1 ml, pero hay rangos de entre 0.7 a 2 ml (Randall y Mushtaq, 1980). Sin embargo, cuando el eyaculado se obtiene por medio del método de electroeyaculación el volumen es un poco mayor, pero de menor concentración (Hafez, 1989b; Evans y Maxwell, 1990). El volumen en general puede verse afectado por la edad, condición del animal, frecuencia de colección, habilidad del operador, nutrición y época del año (Evans y Maxwell, 1990). En general los animales jóvenes o viejos, de menor talla o de condición corporal no satisfactoria, presentan eyaculados de menor volumen (Hafez, 1989b; Evans y Maxwell, 1990).

2.2.3.- Motilidad del semen.

Es una de las pruebas más extensamente usadas para determinar la calidad del semen (Randall y Mushtaq, 1980). La motilidad se valora mediante la observación del movimiento del semen en ondas (motilidad en masa), o mediante el movimiento progresivo (motilidad individual) de los espermatozoides en una muestra (Randall y Mushtaq, 1980; Evans y Maxwell, 1990). El movimiento en masa es usualmente descrito en grados o escala (Evans y Maxwell, 1990).

El procedimiento para obtener el valor de la motilidad en masa es utilizando una gota de semen, sin diluir, sobre un portaobjetos limpio, seco, y previamente calentado a una temperatura de 37°C, observando la onda con pocos aumentos (4x ó 10x) (Randall y Mushtaq, 1980; Hafez, 1989a; Evans y Maxwell, 1990).

La estimación de la motilidad en masa de los espermatozoides se hace sobre la base del vigor o potencia de la onda y se valora de 0 a 5 normalmente, correspondiendo los valores de la forma siguiente:

Valor	Equivalencia	espermatozoides activos %
0	muerto	0
1	muy pobre	alrededor del 10
2	pobre	20-40
3	regular	45-65
4	bueno	70-85
5	muy bueno	90

Esta forma de valoración es considerada subjetiva (Randall y Mushtaq, 1980; Evans y Maxwell, 1990). Las muestras con muy buena o buena clasificación (4 y 5) se pueden utilizar para inseminación artificial, las muestras con valor de 3 o menos se recomienda no utilizarlas para inseminación, ya que pueden presentar una fertilidad menor en caso de congelarlas, ya sea en pellets o en pajillas (Evans y Maxwell, 1990).

Además, se debe calcular el valor de la proporción de espermatozoides progresivamente móviles en el semen (motilidad progresiva o individual), tanto antes como después de congelarlo (Evans y Maxwell, 1990). Este procedimiento es muy importante cuando el semen va ser utilizado en programas de inseminación artificial.

El cálculo del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento de cada uno de ellos puede hacerse mediante la observación en el microscopio. La movilidad de los espermatozoides del eyaculado o de la suspensión diluida se valora en varios campos en el microscopio óptico, utilizando una preparación delgada mantenida a 37°C durante todo el procedimiento. En esta preparación se evalúa el porcentaje de espermatozoides móviles y si es posible la velocidad del movimiento (Hafez, 1989a). La velocidad y tipo de movimiento de los espermatozoides, puede variar según un gran número de factores: método de colección del semen, factores ambientales, manejo después de la colección, intervalo entre colecciones y la valoración y variaciones individuales del propio seminal (Evans y Maxwell, 1990).

La determinación de la movilidad es un método relativamente sencillo para conocer la calidad del semen.

Los espermatozoides pueden tener los siguientes tipos de movimiento:

- 1) Movimiento progresivo.
- 2) Movimiento circular o rotatorio.
- 3) Movimiento oscilatorio o convulsivo sin progreso ni cambio de posición (Evans y Maxwell, 1990).

La motilidad individual se valora generalmente en porcentaje (0-100%). Para la inseminación artificial sólo deben usarse aquellos eyaculados que presenten altas proporciones de espermatozoides con motilidad progresiva (más del 70 %) (Evans y Maxwell, 1990).

2.2.4.- Concentración de los espermatozoides.

La concentración de espermatozoides es el término que se le da al número de espermatozoides por unidad de volumen de eyaculado (ml) y de ella depende directamente el grado de dilución, en caso de utilizar el semen para inseminación artificial (Evans y Maxwell, 1990; Radillo, 1992).

La concentración normal del semen de carnero de buena calidad es aquella que contiene un promedio de 3.5 a 6 mil millones de espermatozoides por mililitro. Esta concentración de

espermatozoides puede ser valorada en base a la consistencia o apariencia del semen (a nivel de campo) o con la ayuda de un hemocitómetro, colorímetro o contador electrónico de partículas (Coulter). Cada método varía en su rapidez y seguridad (Evans y Maxwell, 1990).

La valoración de la concentración basada en la consistencia o apariencia del semen depende de sus dos constituyentes, espermatozoides y plasma seminal. Las muestras de semen con alta consistencia contienen más espermatozoides y viceversa, para ello se le ha dado una valoración de un rango de 0 a 5, correspondiendo cada valor de la siguiente forma:

Valor	Consistencia o apariencia
5	cremosa espesa
4	cremosa delgada
3	cremosa tenue
2	lechosa
1	nebulosa
0	clara o acuosa

El método del colorímetro es rápido y seguro, se basa en la cantidad de luz que pasa a través de la muestra, pero al igual que los contadores electrónicos de partículas, son caros y no prácticos para utilizarse como técnicas de campo.

El método del hemocitómetro es el más lento pero también es el más seguro. Se utiliza para cuantificar el número de espermatozoides en una muestra de tamaño definido, para posteriormente calcular el total del eyaculado. Para ello se utiliza cualquier solución que inmovilice rápidamente a los espermatozoides para su conteo (Randall y Mushtaq, 1980; Evans y Maxwell, 1990; Radillo, 1992).

El hemocitómetro es barato y de fácil adquisición y permite la evaluación del semen utilizando diferentes diluciones, así como diferentes tamaños de muestra a evaluar, por lo que aún con poca experiencia se puede cuantificar con precisión la concentración espermática.

2.2.5.- Morfología de los espermatozoides.

El examen morfológico del semen es una prueba de control de calidad detallada que se aconseja realizar en un programa de inseminación artificial y en el examen reproductivo general. Generalmente, cada eyaculado contiene una proporción de espermatozoides anormales. Sin embargo, si esta proporción es alta (mayor a 20%), resulta en una disminución de la fertilidad del semen eyaculado (Evans y Maxwell, 1990; Radillo, 1992).

Para el examen morfológico del semen se utilizan frotis teñidos con diferentes colorantes, el más utilizado está hecho a base de eosina-nigrosina. Esta tinción permite observar además de espermatozoides muertos, anomalías tales como los espermatozoides decapitados, macrocefálicos, microcefálicos, cola enroscada, cabeza alargada, cuello y cola rota o acrosoma anormal. Estas anomalías morfológicas de los espermatozoides pueden ser primarias o secundarias, las primeras se deben a fallas durante la espermatogénesis, en tanto que las secundarias ocurren durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo (Hafez, 1989a; Evans y Maxwell, 1990).

Aquellas muestras de semen con más de 15% de anomalías totales no deberán utilizarse para la inseminación artificial (Evans y Maxwell, 1990; Radillo, 1992).

2.3.- DILUCION DEL SEMEN.

Se realiza por razones técnicas(a) y biológicas (b).

a).- Las razones técnicas para diluir el semen se refieren a que una de las mayores ventajas del uso de la inseminación artificial, es el que los sementales de gran valor puedan utilizarse para inseminar muchas más hembras que las que podrían cubrir por monta natural, sin embargo al utilizar la inseminación artificial, tanto el volumen de inseminación como el número de espermatozoides que contiene una dosis se reducen al compararlo con la inseminación

artificial. Esto puede parecer un problema, que se soluciona mediante la dilución del semen, manteniendo una concentración mínima requerida de espermatozoides móviles en el caso del semen congelado (de 180-300 millones/dosis vía cervical y de 20-100 millones/dosis vía intrauterina) en un volumen adecuado, tanto para la inseminación cervical como para la intrauterina (0.05-0.25 ml) y de esta forma mantener el límite inferior generalmente aceptado como resultante de un buen índice de fertilización. (Evans y Maxwell, 1990; Radillo, 1992).

b.- Las razones biológicas de la dilución consisten en proporcionar nutrientes a los espermatozoides, un medio que amortigüe los cambios de pH, que proporcione un ambiente isotónico y que además los proteja del choque térmico por frío al momento de enfriar y posteriormente congelar el semen (Hafez, 1989b; Evans y Maxwell, 1990; Radillo, 1992).

Para la dilución del semen de carnero, cuando va a ser utilizado tanto fresco como congelado, se han desarrollado varios diluyentes en los que se incluyen amortiguadores sintéticos combinados con azúcares, yema de huevo o sus fracciones, leche de varias fuentes, glicerol y otras sustancias (Maxwell y Salamon, 1993).

Estos ingredientes utilizados como componentes de un diluyente se han agrupado ya sea por su origen (naturales y sintéticos) o por la función que representa en el diluyente (amortiguador del pH, nutriente o ambas cosas).

Dentro del grupo de los amortiguadores orgánicos se encuentra el hidroximetil amino-metano (Tris), el N-Tris (hidroximetil) - metilaminooctanosulfónico ácido (TES), el ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico (HEPES) y el 3-(N-morfolino) ácido propano sulfónico (MOPS) que han demostrado tener una mejor capacidad amortiguadora, en comparación con ingredientes antes utilizados con este fin como el fosfato y el citrato (Bharat y Ramamohana, 1980; Maxwell et al., 1984), además de ser relativamente poco tóxicos para el semen.

Los amortiguadores orgánicos actúan penetrando en la célula espermática, evitando así cambios intracelulares del pH e incrementando la tolerancia de las células a un aumento intracelular de cationes monovalentes. Estos amortiguadores incrementan la tonicidad total del

diluyente, lo cual es importante cuando el semen es mantenido congelado por períodos largos o cuando se utiliza para otros métodos de preservación (Maxwell y Salamon, 1993).

El amortiguador orgánico Tris es el más utilizado y ha sido evaluado mediante su utilización para diluir y posteriormente almacenar semen de toro, cerdo y carnero (Maxwell y Salamon, 1993). Así, se ha informado que diferentes concentraciones de Tris (10 a 50 mM) tienen un pequeño o nulo efecto sobre la motilidad y el metabolismo en el semen de carnero (Maxwell y Salamon, 1993).

En cuanto a los otros amortiguadores como el TES, el HEPES y el MOPS, se requieren más investigaciones para evaluar la capacidad amortiguadora en el diluyente (Maxwell y Salamon, 1993).

Los glúcidos o azúcares son componentes importantes en la composición de un diluyente, ya que pueden actuar como fuente de energía para los espermatozoides durante el almacenamiento, como es el caso de la glucosa y de la fructosa. Algunos otros azúcares como la lactosa y la sacarosa actúan sólo manteniendo o incrementando la presión osmótica de el diluyente o de manera extracelular en el espermatozoide, lo que permite mantener la integridad de la membrana de la célula espermática en almacenamiento líquido por largo plazo (Bharat y Ramamohana, 1980; Maxwell et al, 1984; Maxwell y Salamon, 1993).

Normalmente en la composición del semen del carnero, está presente la fructosa, aunque pueden ser metabolizados otros azúcares como la manosa o la glucosa cuando son incluidos en el diluyente de almacenamiento. Se ha informado también que la adición de lactosa mejora la motilidad de los espermatozoides mantenidos a 37°C, y la supervivencia es mejor a 5°C cuando azúcares como la fructosa, glucosa, lactosa o sacarosa son combinados con una simple solución electrolítica (Maxwell y Salamon, 1993).

Es importante también tomar en cuenta que los azúcares, para mantener el metabolismo de los espermatozoides parecen depender de la temperatura de almacenamiento. Es por eso que se requieren más estudios para determinar las relaciones entre la temperatura de almacenamiento, el metabolismo y la permeabilidad de los espermatozoides a varios azúcares (Maxwell y Salamon, 1993).

Algunos otros componentes, como la yema de huevo, han sido incluidos en la elaboración de diluyentes sintéticos con el fin de proporcionar protección a los espermatozoides contra el choque por frío, propiedad que le es conferida por poseer una fracción fosfolípida y una lipoprotéica en su composición. (Watson y Martin, 1972; Maxwell y Salamon, 1993). La fracción lipoprotéica no dializable de la yema de huevo proporciona la mejor protección a los espermatozoides del carnero durante la congelación (Watson y Martin, 1972; Maxwell y Salamon, 1993) lo que sugiere que la baja densidad lipoprotéica es probablemente la fuente de esta protección, ya que estas lipoproteínas presentes en la yema de huevo se unen fuertemente a la membrana plasmática de los espermatozoides (Maxwell y Salamon, 1993; Molina *et al.*, 1994b). Jones y Martin (1973) informan que la inclusión de un 3% de yema de huevo en un diluyente a base de glucosa-fosfato, reduce la frecuencia de cambios en el acrosoma y de piezas medias en los espermatozoides de carnero mantenido en refrigeración a 5°C por más de 72 horas. Sin embargo, las altas concentraciones de yema de huevo en diluyentes utilizados para la congelación de semen de carnero pueden provocar una reducción de la fertilidad del semen. Este efecto en el semen del carnero no ha podido ser explicado aún (Maxwell y Salamon, 1993) a diferencia de otras especies como es el caprino, en donde se ha determinado que al agregar altos porcentajes de yema de huevo al semen, se produce una reacción enzimática provocada por la presencia de la enzima fosfolipasa A en el plasma seminal, que es producida por las glándulas bulbouretrales, la cual actúa coagulando la yema de huevo, mediante la hidrolización de las lecitinas a lisolecitinas y ácidos grasos (Chauhan y Anand, 1990; González, 1990).

Por el contrario, se ha demostrado que la yema de huevo reduce la pérdida de enzimas acrosomales y previene cambios degenerativos en el acrosoma durante la conservación del semen a 5°C (Jones y Martin, 1973; Evans y Maxwell, 1990; González, 1990; Maxwell y Salamon, 1993) y durante su congelación, como mencionan Watson y Martin (1972) en un estudio donde informan que la combinación de yema de huevo con los diferentes

crioprotectores en los diluentes es benéfico para la congelación de semen de carnero.

Además de la yema de huevo existen, otros agentes crioprotectores como son el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO) ya sea solos o en combinación, los cuales se han clasificados como agentes penetrantes (Snedeker y Gaunya, 1970; Bustamante, 1981b) . La protección de estos compuestos se basa en la restricción de la congelación intracelular y en la reducción al mínimo del daño celular debido a los solutos concentrados en el medio durante el enfriamiento. Esto se explica por la acción coligativa que tienen estos compuestos, de tal manera que reducen la cantidad de agua intracelular. Los agentes penetrantes crean el ambiente adecuado para la reducción del contenido del agua de la célula a temperaturas suficientemente bajas para reducir el efecto nocivo de los solutos concentrados en la célula (Bustamante, 1981b; González, 1990). González (1990) menciona además que el glicerol permite que la formación de cristales de hielo sea en forma de capas, en vez de agujas que cortan al espermatozoide lisándolos y provocando su muerte (González, 1990).

La cantidad de glicerol necesaria para proteger los espermatozoides varía con el método de congelación y la composición y tonicidad del diluyente (Salamon y Maxwell, 1995a), ya que Fraser (1968) al igual que Jones (1969) y Colas (1975) determinaron que el nivel óptimo de glicerol para diluir semen de carnero parece ser alrededor del 4%, mientras que First *et al* (1961) encontraron que la concentración de glicerol más satisfactoria fue de 6 a 8%.

Algunos autores mencionan que la adición de antibióticos, como agentes antimicrobianos es muy útil para controlar los microorganismos presentes en el semen diluido y almacenado a temperaturas más altas. Combinaciones de antibióticos como la penicilina y estreptomycinina son los más comúnmente usados ya que proporcionan un amplio espectro de actividad antibacteriana y no son tóxicos para los espermatozoides (Hafez, 1989b).

2.4.- CONGELACION DEL SEMEN.

Una conservación adecuada del semen, permite hacer un uso generalizado de los sementales y la preservación de material genético para su uso futuro. Es por eso que la

finalidad de conservar el semen, es detener o disminuir su motilidad y reacciones metabólicas, prolongando así la capacidad de fertilización de los espermatozoides.

Esta conservación puede hacerse en forma líquida para su utilización a corto plazo o congelarse para usarse a largo plazo (Evans y Maxwell, 1990).

El método de almacenamiento líquido, consiste en disminuir la temperatura del semen que ha sido diluido, desde 30°C (temperatura de dilución) a una temperatura de 15°C o más comúnmente a 5°C, manteniéndolo en este rango hasta su utilización o para su posterior congelación (Radillo, 1992). El enfriamiento para alcanzar los 5°C, deberá hacerse de manera gradual en un tiempo de 2-3 horas, esta disminución gradual de la temperatura se hace para evitar el choque por frío que se produce cuando se hace un descenso rápido de la temperatura (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995a).

En lo que se refiere al método de congelación, este consiste en disminuir la temperatura del semen hasta -196°C mediante la utilización de nitrógeno líquido, ello permite que las reacciones metabólicas de los espermatozoides queden detenidas y con ello también la producción de ácido láctico metabólico por parte de ellos mismos, el cuál, al acumularse en el semen, provoca que descienda el pH reduciendo de esta forma, irreversiblemente la viabilidad de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

La congelación de semen puede hacerse envasando en ampollitas y en forma de pellets o pajillas. Salamon (1968) informó que después de congelar semen con los tres métodos y con una diferente tasa de enfriamiento en cada caso, la motilidad espermática después de la descongelación fue mayor para semen congelado en ampollitas y pellets que cuando se hizo en pajillas. Sin embargo, la tasa de nacimientos fue baja en los tres tipos de congelación. Graham et al (1978) observaron que la fertilidad del semen congelado en pajillas y en pellets varía dependiendo de la temperatura utilizada en la descongelación, (65°C vs 40°C, respectivamente) donde los resultados de nacimientos fueron mejores para el semen congelado en pajillas que para el semen congelado en pellets, pero no ocurrió lo mismo cuando la

temperatura de descongelación para ambos métodos fue la misma (40°C vs 40°C) ya que se encontraron resultados similares.

Datos diferentes sobre los resultados entre ambos métodos han sido informados, ya que algunos autores recomiendan como mejor método de congelación las pajillas (Zaicev *et al.*, 1989; Pontbriand *et al.*, 1989.) y otros como mejor método a los pellets (Maxwell *et al.*, 1980; Schmehl *et al.*, 1986; Landers *et al.*, 1992).

Sin embargo, cabe mencionar que ambos métodos tienen resultados similares de nacimientos cuando el semen es utilizado para inseminación intrauterina (Hunton *et al.*, 1987).

Debido a la dificultad que representa el inseminar intracervicalmente con semen congelado-descongelado por los bajos coeficientes de fertilidad y prolificidad que se obtienen, los programas de inseminación artificial comercialmente se vieron limitados durante mucho tiempo (Evans y Maxwell, 1990). Recientemente con el uso de la inseminación artificial intrauterina por medio de la técnica de laparoscopia, los índices de fertilidad que eran bajos, han mejorado, ya que el problema que representaba la reducida viabilidad del semen congelado y la posterior dificultad para obtener suficiente población de espermatozoides viables en el cérvix y de su transporte a través de este y del útero han sido resueltos en gran parte con esta técnica.

Las ventajas que se han podido obtener con la inseminación intrauterina por medio de la laparoscopia, ha provocado que nuevamente se retome el uso de la congelación del semen tanto en pellets (Maxwell *et al.*, 1980; Schmehl *et al.*, 1986; Mathur *et al.*, 1989; Landers *et al.*, 1992; Mathur *et al.*, 1993; Molinia *et al.*, 1994a) como en pajillas (Graham, 1978; Zaicev *et al.*, 1989; Pontbriand *et al.*, 1989; Graham, 1994).

Independientemente del método para congelar el semen, deberá utilizarse en el diluyente un agente crioprotector (Evans y Maxwell, 1990).

Cuando se va a congelar el semen ya sea en pellets o pajillas es importante tomar en cuenta dos factores que son el grado de dilución del semen y el efecto del plasma seminal.

Inicialmente el semen fue diluido para proteger los espermatozoides durante su enfriamiento, congelación y descongelación. Sin embargo, el grado de dilución ha sido modificado frecuentemente por razones técnicas, como es el incrementar el número de hembras que pueden ser inseminadas con cada eyaculado o para estandarizar el número de espermatozoides en cada dosis de semen congelado (Salamon y Maxwell, 1995a). Salamon y Maxwell (1995a) mencionan que las primeras investigaciones sobre el grado de dilución de precongelación usadas en algunos trabajos sobre congelación de semen en carneros, variaron desde relaciones 1:11 (semen-diluyente) hasta 1:26, pero la mayoría de estos primeros trabajos y los subsiguientes usaron relaciones entre 1:2 y 1:6 para el grado de dilución del eyaculado. Olafsson (1979, citado por Salamon y Maxwell, 1995a) obtuvo mayores nacimientos después de inseminar cervicalmente con bajas diluciones (1:4) que con altas (1:10) obteniendo 33.3% y 11.8% respectivamente.

Antes de proceder a la dilución del semen se debe determinar el número de espermatozoides y volumen requerido para la inseminación.

El efecto de el plasma seminal sobre el semen congelado ha sido ampliamente estudiado, pero aún permanece la controversia de este efecto (Graham, 1994). Lindholmer (1974) observó que el plasma seminal era importante en el mantenimiento de la motilidad de el semen humano, similares resultados fueron informados en el toro (Amann et al, 1982; Acott y Hoskins, 1987), garañón (Pickett et al, 1975) y conejo (Muller y Kirchner, 1978). Asimismo, Pursel et al (1973) menciona que el plasma seminal en el verraco incrementa la resistencia espermática al daño producido por el choque por frío. Sin embargo, varios estudios han indicado que el plasma seminal tiene poco efecto sobre la motilidad espermática o sobre la susceptibilidad al choque por frío en el verraco (Salamon, 1973; Moore y Hibbitt, 1977), toro y carnero (Wales y White, 1959).

En contraparte, otros investigadores han informado un efecto detrimental del plasma seminal sobre la viabilidad espermática en el verraco (Bamba y Sone, 1981), toro (Shannon,

1965), carnero (Dott *et al.*, 1979; Schmehl *et al.*, 1986), chivo (Nunes *et al.*, 1982) y garañón (Varner *et al.*, 1987).

El efecto del plasma seminal sobre los espermatozoides de un eyaculado durante la criopreservación ha sido evaluado removiendo el plasma seminal por diálisis (Schmehl *et al.*, 1986) o por centrifugación (Pickett *et al.*, 1975; Nunes *et al.*, 1982; Graham, 1994).

Graham (1994) determinó que el efecto producido por la centrifugación, es detrimental para los espermatozoides del eyaculado de carnero, pero no tiene efecto sobre el porcentaje de motilidad espermática en el toro, también determinó que el plasma seminal incrementa el porcentaje de la motilidad espermática del carnero durante el enfriamiento, congelación y descongelación. Algunos autores han mencionado que la centrifugación no tiene un efecto detrimental sobre los espermatozoides (Hammerstedt, 1975 ; Dott *et al.*, 1979), sin embargo, algunos otros mencionan lo contrario (Salamon, 1973; Pickett *et al.*, 1975).

El plasma seminal de los machos generalmente tiene efectos individuales similares sobre los espermatozoides, excepto en algunos casos. Graham (1994) en un análisis para determinar el efecto individual que tiene el plasma seminal en la capacidad de los espermatozoides de poder resistir al daño producido por la congelación, encontró grandes variaciones en los porcentajes de la motilidad espermática, al evaluar los espermatozoides de cada macho dentro del plasma seminal de machos diferentes. Concluyendo de este análisis, que las variaciones en la composición espermática (composición lipídica y protéica) de cada individuo, tiene mayor efecto sobre la supervivencia espermática durante la congelación, que el efecto individual del plasma seminal.

2.5.- DESCONGELACION DEL SEMEN.

Después de la congelación del semen, la fase de descongelación es tan importante para la sobrevivencia de los espermatozoides como lo es la fase de enfriamiento previo a la congelación (Mazur, 1977). Ambos porcentajes (de enfriamiento y de descongelación), ejercen un efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides (Mazur, 1977). Este efecto depende de

1965), carnero (Dott et al, 1979; Schmehl et al, 1986), chivo (Nunes et al, 1982) y gorañón (Varner et al, 1987).

El efecto del plasma seminal sobre los espermatozoides de un eyaculado durante la criopreservación ha sido evaluado removiendo el plasma seminal por diálisis (Schmehl et al, 1986) o por centrifugación (Pickett et al, 1975; Nunes et al, 1982; Graham, 1994).

Graham (1994) determinó que el efecto producido por la centrifugación, es detrimental para los espermatozoides del eyaculado de carnero, pero no tiene efecto sobre el porcentaje de motilidad espermática en el toro, también determinó que el plasma seminal incrementa el porcentaje de la motilidad espermática del carnero durante el enfriamiento, congelación y descongelación. Algunos autores han mencionado que la centrifugación no tiene un efecto detrimental sobre los espermatozoides (Hammerstedt, 1975 ; Dott et al, 1979), sin embargo, algunos otros mencionan lo contrario (Salamon, 1973; Pickett et al, 1975).

El plasma seminal de los machos generalmente tiene efectos individuales similares sobre los espermatozoides, excepto en algunos casos. Graham (1994) en un análisis para determinar el efecto individual que tiene el plasma seminal en la capacidad de los espermatozoides de poder resistir al daño producido por la congelación, encontró grandes variaciones en los porcentajes de la motilidad espermática, al evaluar los espermatozoides de cada macho dentro del plasma seminal de machos diferentes. Concluyendo de este análisis, que las variaciones en la composición espermática (composición lipídica y protéica) de cada individuo, tiene mayor efecto sobre la supervivencia espermática durante la congelación, que el efecto individual del plasma seminal.

2.5.- DESCONGELACION DEL SEMEN.

Después de la congelación del semen, la fase de descongelación es tan importante para la sobrevivencia de los espermatozoides como lo es la fase de enfriamiento previo a la congelación (Mazur, 1977). Ambos porcentajes (de enfriamiento y de descongelación), ejercen un efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides (Mazur, 1977). Este efecto depende de

si el porcentaje de enfriamiento ha sido suficientemente elevado para inducir una congelación intracelular o suficientemente baja para producir deshidratación celular (Parks y Graham, 1992). Tomando en cuenta lo anterior, el uso de la descongelación rápida es requerida para prevenir la recrystalización o la formación de más hielo intracelular presente en los espermatozoides (Mazur, 1977). Como norma general se menciona que cuanto más rápido se congele el semen más rápidamente se debe descongelar a una temperatura no inferior a los 37°C (Evans y Maxwell, 1990). La descongelación a una temperatura mayor de 37°C, puede mejorar la recuperación de los espermatozoides viables, pero existe el peligro de la exposición del semen a temperaturas por encima del nivel crítico, que pueden ser fatales para los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

La descongelación dependerá mucho del método utilizado para la congelación del semen, ya que cuando se ha utilizado el método en pellets, puede hacerse utilizando una solución descongelante (un azúcar + citrato + yema de huevo, generalmente) o simplemente descongelarlos en seco, utilizando tubos de vidrio mantenidos en baño María (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995a). Inicialmente, dentro del proceso de descongelación de pellets, fueron informadas más ventajas al utilizar una solución descongelante, que utilizando sólo simples tubos de vidrio (Salamon y Maxwell, 1995a). Esto se debe a la capacidad que tiene la solución descongelante de aumentar el ritmo de descongelación y de proporcionar además algún grado de protección a los espermatozoides que no se encuentran letalmente afectados por el proceso de la congelación. Sin embargo, debe advertirse que aunque una solución descongelante puede tener un efecto benéfico sobre la recuperación de los espermatozoides, también puede no ser el medio óptimo para el mantenimiento de la viabilidad de los mismos (Evans y Maxwell, 1990). De ahí que además de tomar en cuenta la presencia de la solución descongelante es importante su composición, ya que ambos factores influyen en la recuperación de la motilidad espermática (Salamon y Maxwell, 1995a). La solución descongelante no debe exceder la relación 1:3 (volumen del pellet + volumen de solución descongelante) debido a la existencia de una relación entre la

composición del diluyente pre-congelado y la solución descongelante (Evans y Maxwell, 1990). Salamon y Visser (1972) encontraron la existencia de esta relación entre la composición de la solución congelante y la solución de descongelación, cuando utilizaron de ingrediente al Tris como base en la preparación de la solución.

Otras diferencias que se han observado en la descongelación de pellets, entre el método en seco y el método utilizando una solución descongelante, ocurren al descongelar pellets a una temperatura de entre 38-40°C y utilizando temperaturas por abajo de estos grados. Se obtienen mejores resultados al evaluar los pellets utilizando una solución descongelante a base de citrato mantenida a una temperatura entre 38-40° C (Salamon, 1968; Salamon y Maxwell, 1995a). En otros estudios se encontró que los resultados en la recuperación de los espermatozoides al descongelar semen a una temperatura entre 30 y 45°C (Salamon, 1968 y 1970) no fueron muy diferentes entre cada grado, pero sí se observaron diferencias cuando se descongeló semen a 37, 45, 60 y 75°C, en donde la descongelación a 37°C fue mejor que las demás temperaturas utilizadas (Fukui, 1979).

El semen congelado en pajillas ha sido descongelado a temperaturas entre 38 a 42°C (Salamon y Maxwell, 1995a). Sin embargo, Andersen y Aamdal (1972) informaron que la motilidad postdescongelación a una temperatura de 75°C fue superior que la obtenida con 35°C, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos por Angulo (1988), en donde se comparó la descongelación de pajillas a una temperatura de 36 y 70°C, durante tiempos de 4 y 8 segundos con ambos grados de temperatura, al final los porcentajes obtenidos utilizando 36°C de temperatura en la descongelación fueron mejores en ambos tiempos. Johnson *et al* (1974) encontraron que el descongelar a 69°C es más ventajoso para la recuperación de la motilidad espermática, mientras que a una temperatura de 45.6°C se preserva mejor la integridad acrosomal del espermatozoide.

III.- MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (C.E.I.E.P.O.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el cual se encuentra ubicado en el km 53.1 de la carretera federal México-Cuernavaca, en el pueblo de Tres Marías, Huitzilac, Mor. a una altura de 2830 m sobre el nivel del mar, a 19°02' de latitud norte y 99°16' de longitud oeste. El clima es Cb (m)(w) ig con lluvias en verano, con una precipitación pluvial promedio de 1245 mm y una temperatura media anual que oscila entre 12° y 18°C (García, 1981).

3.1.- COLECCION DEL SEMEN.

Para la colección de semen se utilizaron en total 9 carneros adultos de dos razas (2 Rambouillet y 7 Suffolk). De ellos se obtuvo un total de 30 eyaculados.

La vagina artificial que se utilizó para la colección del semen mide de 20 cm X 5.5 cm, la cual a la hora de la colección fue mantenida a una temperatura de 42 a 45°C y conectada a uno de sus extremos una copa colectora graduada en mililitros que tenía una temperatura de 30-37°C al momento de recibir el eyaculado (Hafez, 1989a; Evans y Maxwell, 1990). Se cuidó que la copa estuviera cubierta para evitar los rayos del sol. Después de la obtención, el semen se colocó en baño María a 30°C para igualar su temperatura con la de ambos diluyentes previamente colocados en el baño María (Evans y Maxwell, 1990).

3.2.- EVALUACION Y DILUCION DEL SEMEN.

Cada eyaculado colectado fue evaluado en los siguientes puntos: color, volumen, concentración, motilidad y morfología (Evans y Maxwell, 1990).

Una vez obtenido el semen el volumen del eyaculado se midió directamente en la copa colectoras, evitando así cualquier manejo adicional para este fin.

De cada eyaculado colectado se tomó una pequeña gota para determinar el porcentaje de motilidad progresiva y una muestra para la concentración espermática. La evaluación de la motilidad progresiva se hizo utilizando un portaobjetos mantenido a 37°C y observando la muestra en un microscopio óptico para determinar el porcentaje correspondiente a cada eyaculado. Únicamente se utilizaron eyaculados con una motilidad progresiva mínima del 70%. La concentración espermática se evaluó mediante el hematocitómetro, utilizando una solución de formalina mas eosina en una dilución 1:200 (semen:solución)(Evans y Maxwell, 1990). La determinación de anomalías morfológicas se realizó utilizando frotis del semen teñidos con el colorante eosina-nigrosina (Evans y Maxwell, 1990).

Cada eyaculado fue dividido en dos partes iguales para proceder a una dilución inicial 1:1 (semen-diluyente) con el diluyente A (Tris-glucosa-yema de huevo)(Salamon y Visser, 1972) y la otra mitad con el diluyente B (lactosa-yema de huevo)(Nagase y Niwa, 1964).

El semen una vez diluido en un tubo de centrifuga se colocó en un vaso de precipitado con agua a 30°C, se introdujo al refrigerador a 5°C, en donde permaneció 2 horas (tiempo de equilibrio) (Jones y Martin, 1973).

Después de haber calculado la concentración espermática se añadió el resto del diluyente al término del período de equilibrio (dilución final), de manera que la concentración final de las dosis fuera de 100 millones de espermatozoides móviles en un volumen de 0.1 ml. Durante este procedimiento, el diluyente se mantuvo a la misma temperatura que el semen (5°C), para evitar variaciones en la temperatura al realizar la dilución final.

3.3.- ELABORACION DE LOS DILUYENTES.

La fórmula de los diluyentes que se utilizaron en este trabajo son los siguientes:

Diluyente A:

Tris _____	4.361g
Glucosa _____	0.600g
Acido cítrico _____	2.388g
Sulfato de estreptomicina _____	0.005g
Penicilina _____	0.006g
Glicerol _____	6.0 ml
Agua tridestilada _____	76.0ml

Por cada 10 ml de la solución anterior se agregaron 2.2 ml de yema de huevo.

Diluyente B:

Lactosa _____	5.5g
Agua tridestilada _____	aforar a 50 ml

De esta solución al 11% se agregaron por cada 7.4 ml:

Glicerol _____	0.6 ml
Yema de huevo _____	2.0 ml
Sulfato de estreptomicina _____	0.005g
Penicilina _____	0.006g

Una vez preparados ambos diluyentes, se procedió a inactivar la yema de huevo (las lecitinas específicamente), colocando los diluyentes en baño María a 56°C, durante 30 minutos (Flores-Foxworth, comunicación personal).

Posteriormente los diluyentes se mantuvieron en baño María a 30°C , durante media hora previo a la dilución inicial del semen.

3.4.- ELABORACION DE LOS PELLETS.

Después de las 2 h del período de equilibrio (Jones y Martin, 1973) se procedió a elaborar los pellets haciendo pequeños agujeros sobre una placa de hielo seco con la ayuda de una plancha metálica especial (Evans y Maxwell, 1990) y se depositaron 0.1 ml de semen diluido (concentración de 80-100 millones / dosis) en cada orificio, con la ayuda de una jeringa para insulina y una aguja del número 18.

Después de 15 minutos, los pellets congelados se envasaron en recipientes de plástico previamente identificados y fueron introducidos en el nitrógeno líquido.

Para la evaluación del semen ya congelado se tomaron como muestra 5 pellets de cada eyaculado preparado con cada uno de los dos diluyentes (300 en total); solamente se consideró la motilidad progresiva (individual) al descongelar. La descongelación se realizó utilizando pequeños viales de vidrio los cuales contenían un volumen de 0.15 ml de solución salina fisiológica (para obtener un volumen total de 0.25 ml al descongelarse el pellet), manteniéndolos en un baño María a una temperatura de 37°C por 10 a 15 segundos, tiempo en que tardó en descongelarse el pellet. Posteriormente, con una pipeta Pasteur se tomó una gota pequeña de la muestra y se colocó en un portaobjetos calentado previamente a 37°C en una termoplatina, para evitar así variaciones en la temperatura antes de ser observado y evaluado en el microscopio (Bustamante, 1981b; Evans y Maxwell, 1990).

3.5.- ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento de modelos lineales generales (PROC GLM) del paquete estadístico SAS (SAS/STAT, 1991), en el cual se tomó a la motilidad progresiva (individual) como variable dependiente y transformando los valores expresados en porcentaje al arcoseno (Steel y Torrie, 1980) utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + S_j + \beta MI_{ij} + E_{ij}$$

Donde

Y_{ij} = La motilidad progresiva para el i-ésimo diluyente con el j-ésimo semental.

μ = Media poblacional constante

T_i = Efecto de i-ésimo tratamiento de diluyente

S_j = Efecto del j-ésimo semental

βMI_{ij} = Efecto de la motilidad inicial considerado como covariable

E_{ij} = Error

* En un primer modelo analizado se consideró como variable independiente a la raza de los sementales, sin embargo ésta no fue significativa, por lo que se decidió no considerarla en un modelo final.

IV.- RESULTADOS

Después de evaluar la totalidad de los eyaculados se encontró que el semen a congelar presentó solamente un 10% de anomalías (primarias y secundarias) en total, mientras que el promedio de la concentración espermática fue de 3.13×10^9 espermatozoides/ml.

En el cuadro 1, se presenta el porcentaje de la motilidad en masa obtenida en los diferentes eyaculados, teniendo como mínimo un 80% de motilidad.

CUADRO 1. Motilidad en masa y concentración espermática de los diferentes eyaculados evaluados.

NUMERO DE MACHO	NUMERO DE EYACULADOS	CONCENTRACION ESPERMATICA PROM. /EYACULADO (10^6)	PORCENTAJE DE LA MOTILIDAD EN MASA
1	3	117.66	80.00
2	2	298.75	86.25
3	1	289.00	85.00
4	1	150.00	90.00
5	2	342.50	80.00
6	2	145.50	80.00
7	8	423.71	84.37
8	2	392.00	82.50
9	7	451.57	81.42

En el cuadro 2, se presentan los porcentajes de la motilidad progresiva antes de la congelación y después de haberse realizado la dilución inicial. Como puede observarse, estos porcentajes iniciales no presentaron una gran variación entre los eyaculados de cada semental, ni entre los dos diluyentes evaluados.

CUADRO 2. Porcentajes de la motilidad progresiva inicial para ambos diluyentes.

NUMERO DE MACHO	NUMERO DE EYACULADOS n=30	MOTIL. PROGR. TRIS-GLUCOSA YEMA DE HUEVO	MOTIL. PROGR. LACTOSA-YEMA DE HUEVO
1	3	75.00	75.00
2	4	78.75	81.25
3	1	75.00	85.00
4	1	85.00	80.00
5	2	80.00	70.00
6	2	77.50	77.50
7	8	83.13	79.37
8	2	77.50	80.00
9	7	78.57	80.00

ESTA TESIS NO DEBE
VALOR DE LA BIBLIOTECA

En el cuadro 3, se presentan los porcentajes de la motilidad progresiva inicial y al descongelado. Después de transformar al arcoseno los porcentajes de la motilidad progresiva al descongelado, se encontraron diferencias significativas entre los diluyentes, siendo mayor la motilidad del semen diluido en lactosa-yema de huevo.

CUADRO 3. Porcentajes de la motilidad progresiva inicial y postdescongelamiento.

	MOTILIDAD INICIAL %	MOTILIDAD AL DESCONGELADO %
TRIS-GLUCOSA- YEMA DE HUEVO	80.00	40.20a
LACTOSA-YEMA DE HUEVO	80.50	45.80b

* Diferente literal indica diferencia significativa ($P < 0.05$).

V.- DISCUSION

Los porcentajes de la motilidad individual obtenidos en este trabajo con los pellets congelados en la solución Lactosa-yema de huevo al momento de la descongelación, no coinciden con los resultados informados por Trejo (1983), Trejo *et al* (1984) y Mathur *et al* (1989), quienes mencionan porcentajes inferiores en la motilidad individual utilizando el mismo diluyente. Sin embargo, es importante resaltar que en este trabajo se utilizó una concentración de 100×10^6 y un volumen de 0.1 ml en la elaboración de los pellets, diluciones diferentes a las utilizadas por estos autores, quienes para la elaboración de los pellets utilizaron concentraciones de 600×10^6 en un volumen de 0.5 ó 1.0 ml (Trejo, 1983; Trejo *et al*, 1984) y concentraciones de 1000×10^6 en un volumen de 0.2 ml (Mathur *et al*, 1989).

Esto pudo, haber sido la causa principal de la diferencia entre los porcentajes de motilidad a la descongelación obtenidos en dichos trabajos (19.4, 25.71 y 15.83 % respectivamente) y el de este trabajo (45.8 %). En cambio, estos resultados apoyan lo expresado por Mathur *et al* (1993), quien observó que mientras más grande y mayor concentración espermática tenga un pellet, la motilidad postdescongelamiento disminuye (Mathur *et al*, 1993), ya que posiblemente los ingredientes que se encuentran en el diluyente no son lo suficientes para proporcionar un adecuado aporte nutricional y protección al espermatozoide durante la congelación. Probablemente al haber usado un grado de dilución del semen diferente en este trabajo, se hayan proporcionado los elementos necesarios para proteger y nutrir a los espermatozoides durante el congelamiento, lo que se tradujo en un mayor porcentaje de la motilidad progresiva al descongelar los pellets. Para hacer un seguimiento de estos mismos pellets congelados con el diluyente lactosa-yema de huevo (Nagase y Niwa, 1964), se utilizaron para la inseminación intrauterina en ovejas superovuladas y se pudo comprobar que el número de embriones transferibles que se recuperó fue igual al obtenido en ovejas que habían recibido monta natural (6.4 ± 1.6 vs 6.9 ± 2.0

embriones para inseminación artificial intrauterina y monta natural respectivamente) (Cerbón et al, 1995). Otro factor que puede haber originado la disminución de la motilidad en el trabajo hecho por Mathur et al(1989) pudo haber sido la temperatura usada en la descongelación de los pellets (45°C). Aunque es cierto que la descongelación a temperaturas superiores a 37°C puede mejorar la recuperación de los espermatozoides viables (Evans y Maxwell, 1990), existe el peligro de que la exposición del semen a temperaturas por encima del nivel crítico puedan ser fatales para los espermatozoides.

Resultados obtenidos por Salamon (1970) y Honmode (1979) con el mismo diluyente, son más parecidos a los obtenidos en este trabajo (34.9 y 38.8 v.s. 45.8, respectivamente). En dichos investigaciones se utilizaron también temperaturas parecidas para la descongelación de los pellets en el baño María (37 y 35°C) y volúmenes semejantes (0.3 y 0.132). Entonces, estas variaciones pueden tener su origen en la utilización de una solución descongelante diferente (glucosa-citrato) a la utilizada por Salamon y Honmode en sus trabajos. Igualmente la concentración diferente de glicerol utilizada por Salamon (4%)(1970), pudo afectar en algún momento el porcentaje de recuperación de la motilidad progresiva al descongelar. Colas (1975) informó que utilizando una concentración de 4% de glicerol, obtuvo 46.7% de recuperación de la motilidad espermática al descongelar el semen, pero la comparación con este trabajo se dificulta en relación de la recuperación en la motilidad espermática obtenida con esta concentración de glicerol, por el hecho de que se utilizó un método diferente de congelación (pajillas) y porque la adición del glicerol se hizo a una temperatura de 0°C.(Colas, 1975).

Molinia et al (1994a), mencionan que al congelar semen de carnero en pellets utilizando el diluyente Tris-glucosa-yema de huevo, se obtienen porcentajes de motilidad postdescongelamiento de 40.9, 44.6 y 51.7. Estas diferencias, pueden deberse a que evaluaron diferentes concentraciones de glicerol (1.5,3.0, y 6.0 %), resultando en un promedio de recuperación de la motilidad del 45.7 %, lo cual no coincide en su totalidad con la recuperación obtenida en este trabajo (40.2 %). (Cuadro 3). Sin embargo, los porcentajes

obtenidos en ambos trabajos (45.7 y 40.2 %), se encuentran dentro de la proporción (40 - 60 %) de recuperación espermática mencionada por Salamon en una revisión de protocolos de congelación de semen (Salamon y Maxwell, 1995b). Probablemente estas diferencias en el porcentaje de motilidad que obtuvieron, se deban a las diferentes proporciones entre algunos ingredientes, por ejemplo glicerol o la yema de huevo. Es conocido que las altas concentraciones de yema de huevo en el diluyente actúan de manera desfavorable sobre la motilidad y la fertilidad. Además, en la yema de huevo se encuentra una enzima llamada lecitina la cual al ser hidrolizada provoca cambios degenerativos en la estructura acrosomal del espermatozoide (Maxwell y Salamon, 1993, Molinia et al, 1994a). En el presente trabajo este factor fue descartado, ya que después de elaborados los diluyentes se expusieron a 56°C durante 30 minutos en baño María, lo que inactivó las lecitinas evitando con ello sus efectos tóxicos al hidrolizarse a lisolecitinas y ácidos grasos.

El hecho de que haya existido diferencia estadística significativa en la recuperación de la motilidad espermática entre los diluyentes A y B ($P < 0.05$) que se utilizaron para la congelación de semen de carnero en este trabajo, pudo ser debido a los diferentes porcentajes utilizados de glicerol (7.31% (Diluyente A) x 6% (Diluyente B)) y de yema de huevo (18.03% (Diluyente A) x 20% (Diluyente B)). Sin embargo, estos porcentajes concuerdan con los niveles óptimos mencionados por Salamon y Maxwell (1995a) en una revisión hecha sobre congelación de semen, en la cual dicen que se han obtenido buenos resultados de recuperación espermática utilizando porcentajes similares de concentración en ambos ingredientes.

También las diferencias entre ambos diluyentes pueden deberse al efecto individual que tienen los espermatozoides de cada semental, en función con la capacidad que posean de poder resistir la congelación dentro del diluyente que se use, aunque no se puede afirmar completamente debido a los pocos trabajos hechos sobre este efecto. Graham (1994) evaluó el efecto individual del plasma seminal durante la congelación, concluyendo que las variaciones en la composición espermática (lipídica y protéica) de cada individuo tiene un mayor efecto sobre la supervivencia espermática durante la congelación, que el efecto individual del plasma seminal (Graham, 1994), lo cual concuerda con lo anteriormente mencionado en este trabajo.

VI.- CONCLUSIONES

Utilizando el método de congelación en pellets, el diluyente elaborado a base de Lactosa-yema de huevo fue superior al diluyente hecho con Tris-glucosa-yema de huevo, una vez que se determinó la recuperación de la motilidad progresiva al descongelar los pellets a 37°C.

VII.- LITERATURA CITADA

Acott, T.S. and Hoskins, D.D.: Bovine sperm forward motility protein partial purification and characterization. J. Biol. Chem., **253**: 6744-6750 (1987).

Amann, R.P., Hay, S.R. and Hammerstedt, R.H.: Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. Biol. Reprod., **27**: 723-733 (1982).

Andersen, K. and Aamdal, J.: Artificial insemination with frozen semen in sheep in Norway. World Rev. Prod., **8** : 77-79 (1972).

Angulo, M.R.: Determinación de la temperatura y tiempo óptimo para la descongelación del semen ovino. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1988.

Armstrong D.T., Evans G.: Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. J. Reprod. Fertil., **71**:89-94 (1984).

Bamba, K., Sone, M.: Factors affecting the quality of boar semen stored by means of dialysis. J. Reprod. Sci., **62**: 193-197 (1981).

Bharat C.D. and Ramamohana R.A.: Preservation of ram semen. Indian Vet. J. **57**:130-134 (1980).

Bustamante, G.: Evaluación del semental. En: Memorias del curso de actualización: Aspectos de producción Ovina. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1980, 116-122. ed. PADEP, México, D.F. (1981a).

Bustamante, G.: Congelación de semen ovino. En: Memorias del curso de actualización: Aspectos de producción ovina. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1980, 128-142. PADEP, México D.F. (1981b).

Cerbón, J.L., Valencia, J., Balcázar, A., Zarco, L., Luyando, C., Saharrea, A. y Mejía, O.: Recuperación de embriones en ovejas superovuladas inseminadas intrauterinamente o por monta natural. Memorias del VIII Congreso Nacional de Producción Ovina. Chapingo, México. 112-116 (1995).

Chauhan, M.S. and Anand, S.R. : Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. Theriogenology, **34**: 1003-1013 (1990).

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).

Dott, H.M., Harrison, R.A.P., and Foster, G.C.A.: The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. J. Reprod. Fertil., **55** : 113-124, (1979).

Evans, G. and Maxwell, W.M.C. Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats.: Butterworths Pty Limited, Sydney Australia, (1990).

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).

Fraser, A.F.: Progress in the artificial insemination of sheep with frozen semen. Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem., Paris, 2: 1033-1035 (1968).

Fukui, Y.: Effect of different diluents, thawing temperatures and materials of thawing containers on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Jap. J. Anim. Reprod., 25: 160-169 (1979).

García, M.E.: Modificación al sistema de clasificación climática de Koppen 3a, Offset Larios México, D.F. 1981.

González, H.G.: Congelación de semen caprino en pajillas francesas de 0.5 ml evaluándolo a diferentes ritmos de descongelación. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1990.

Graham, E.F., Crabo, B.G. and Pace, M.M.: Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci., 47(Suppl.2): 80-119 (1978).

Graham J.K.: Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. Theriogenology, 41: 1151-1162 (1994).

Hafez, E.S.E.: Estudios del semen. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales 5a ed. Editado por: Hafez, E.S.E., 491-518. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México, D.F. (1989a).

Hafez, E.S.E.: Inseminación Artificial. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales 5a ed. Editado por: Hafez, E.S.E., 519-535. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México, D.F. (1989b).

Hammerstedt, R.H.: Use of high speed dialysis to prepare bovine sperm for metabolic studies. Biol. Reprod., 15: 389-396 (1975).

Hawk, H.W.: Sperm survival and transport in the female reproductive tract. J. Dairy Sci., 66: 2645-2660 (1983).

Honnode, J.: Observations on some factors influencing vitality of ram semen during its freezing and thawing. Ind. Vet. J., 56: 663-666 (1979).

Hunton, J.R., Flecker, S.E. and Maxwell, W.M.C.: Intra-uterine insemination with pellet or straw-frozen ram semen. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol., 19: 41, Abstr. (1987).

Johnson, L., O'Connor, M.L., Chandler, P.T., Meacham, T.N. and Saacke, R.G.: Optima of glycerol, Tris and thaw rate in freezing ram semen. J. Anim. Sci., 39: 213, Abstr. (1974).

Jones, R.C.: Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deep-frozen ram spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 22: 995-1004 (1969).

Jones, R.C. and Martin, I.C.A.: The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. J. Reprod. Fert., **35**, 311-320 (1973).

Killeen, I.D. and Caffery, G.J.: Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. Aust. Vet. J., **59**: 95 (1982).

Klug, E., A. Günzel, H. Merkt, U.D. Krause: Untersuchungen Von Hengsten zum Einsatz in der instrumentellen Samenübertragung mit Tiefgefriersperma. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **84**, 236-238 (1977).

Landers, A.J., Molinia, F.C., Evans, G. and Maxwell, W.M.C.: Survival of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minutubes. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol., **24** : 20 Abstr.(1992).

Lindholmer, C.H.: The importance of seminal plasma for human sperm motility. Biol. Reprod., **10** : 533-542 (1974).

Mathur, A.K., Srivastava, R.S., Anil J. and Kalra, D.B. : Pellet freezing of ram semen. Indian J. Anim. Sci., **59**: 1529-1531 (1989).

Mathur, A.K., Anil, J., Srivastava, R.S. and Rawat, P.S.: Effect of larger pellet volumes frozen on round and flat glass surfaces on cryosurvival of ram spermatozoa. Indian J. Anim. Sci., **63** (4):427-429 (1993).

Maxwell, W.M.C., Curnock, R.M., Logue, D.N. and Reed, H.C.B.: Fertility of ewes following artificial insemination with semen frozen in pellets or straws, a preliminary report. Theriogenology, **14** : 83-89, (1980).

Maxwell, W.M.C., Butler, L.G. and Wilson, H.R. : Intrauterine insemination of ewes with frozen semen. J. Agric. Sci. Camb., **102** : 233-235 (1984).

Maxwell, W.M.C. and Salamon, S.: Liquid Storage of Ram: a Review. Reprod. Fertil. Dev., **5**, 613-638 (1993).

Mazur, P.: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology, **14** : 251-272, (1977).

Molinia, F.C., Evans, G. and Maxwell, W.M.C.: Effect of polyols on the post-thawing motility of pellet-frozen ram spermatozoa. Theriogenology, **42** : 15-23 (1994a).

Molinia, F.C., Evans, G. and Maxwell, W.M.C.: Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. Theriogenology, **42**: 727-737 (1994b).

Moore, H.D.M. and Hibbitt, K.G. : Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. J. Reprod. Fert., **50** : 349-352 (1977).

Moore, R. and Miller, C. : Goat Reproduction. African Goat Flocks Limited. New Zealand (1993).

Muller, B. and Kirchner, C. : Influence of seminal plasma proteins on motility of rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fert., **45** : 167-172 (1978).

Nagase, H., Niwa, U.T.: Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. 5. Int. Kongr. für Fortpfl. Haustierbesamung, Trient, 410-415 (1964).

Nunes, J.F., Corteel, J.M., Combarous, Y., Baril, G., Lebocuf, B.: Role du plasma seminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. Reprod. Nutr. Develop., **22**: 611-620 (1982).

Parks, J.E. and Graham, J.K.: Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology, **38**: 209-222 (1992).

Pickett, B.W., Sullivan, J.J., Byers, M.S., Pace, M.M. and Remmenga, E.E.: Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. Fertil. Steril., **26**: 167-174 (1975).

Pontbriand, D., Howard, J.G., Schiewe, M.C., Stuart, L.D. and Wildt, D.E.: Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology, **26**: 341-354, (1989).

Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L.: Effects of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Anim. Sci., **37**: 528-531 (1973).

Radillo, D. J.J.: Inseminación artificial en ovinos: estudio recapitulativo de 1981 a 1991. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zool. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 1992.

Randall, S.O. and Mushtaq, A.M.: Sheep and goat manual. Society for Theriogenology. Vol. X: Missouri-Columbia. 5-33 (1980).

Salamon, S.: Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. Aust. J. Biol. Sci., **21**: 355-360 (1968).

Salamon, S.: The survival of ram spermatozoa following pellet freezing below -79°C. Aust. J. Biol. Sci., **23**: 459-468 (1970).

Salamon, S. and Visser, D.: Effect of composition of Tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Aust. J. Biol. Sci., **25**: 605-618 (1972).

Salamon, S.: Deep freezing of boar semen. III. Effects of centrifugation, diluent and dilution rate, pellet volume and method of thawing on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., **26**: 231-237 (1973).

Salamon, S. and Maxwell, W.M.C.: Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim. Reprod. Sci., **37**: 185-249 (1995a).

Salamon, S. and Maxwell, W.M.C.: Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. Anim. Reprod. Sci., **38**: 1-36 (1995b).

SAS/STAT. Guide for personal computers, version 6.03. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina USA. (1991).

Schmehl, M.K., Vazquez, I.A. and Graham, E.F.: The effect of nonpenetrating cryoprotectant added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thawing motility of ram spermatozoa. Cryobiology, **23**: 512-517 (1986).

Shannon, P.: Presence of a heat-labile toxic protein in bovine seminal plasma. J. Dairy Sci., **48**: 1362-1365 (1965).

Snedeker, W.H. and Gaunya, W.S.: Dimethyl sulfoxide as a protective agent for freezing bovine semen. J. Anim. Sci. **30**: 953-956 (1970).

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: Principles and procedures of statistics. Edit. Mc Graw-Hill, London, (1980).

Trejo, G.A. : Congelación de semen de carnero en pastillas (pellets) I.- Efecto de la congelación sobre la motilidad progresiva, la morfología espermática y la fertilidad. Memorias de la Reunión de investigación pecuaria en México. México, D.F., Noviembre- Diciembre. SARH : 110-113 (1983).

Trejo, G. A., Soto, G.R., Neria, V.B. y Peña, V.M.: Inseminación artificial en ovinos con semen congelado. Memorias de la Reunión de investigación pecuaria en México. México, D.F. Octubre, SARH. : 322-324 (1984).

Valcarcel, A. Heras de las , M.A., Perez, L., Moses, D.F. and Baldassarre.: Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. Theriogenology, **41**: 483-489 (1994).

Varner, D.D., Blanchard, T.L., Love, C.L., Garcia, M.C. and Kenney, R.M.: Effects of semen fraction and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. Theriogenology, **28**: 709-723 (1987).

Wales, R.G. and White, I.G. : The susceptibly of ram spermatozoa to temperature shock. J. Endocrin., **19** : 211-220 (1959).

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).

Westendorf, P., L.Richter U. H. Treu: Zur Tiefgefrierung von Ebersperma-Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberg Pailletnverfahren. Dtsch. Tierärztl. Wschr. **82**, 261-267 (1975).

Windsor, D.P., Szell, A.Z., Buschbeck, C., Edward, A.Y., Milton, J.T.B. and Buckrell, B.C.: Transcervical artificial insemination of australian merino ewes with frozen-thawed semen. Theriogenology, **42** : 147-157 (1994).

Zaicev, V.V., Varnavskaja, V.A. and Varnavskij, A.N.: Diluents for freezing of ram semen (in Russian). Ovtsevodstvo, **6**: 34-35 (1989).