

11663  
2ej. 1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán

EFFECTO DE LA OSMOLALIDAD Y DE LA  
ADICION DE PROSTAGLADINA F2 $\alpha$  AL  
DILUYENTE SOBRE LA CRIOTIVABILIDAD,  
INTEGRIDAD ACROSOMICA Y FERTILIDAD  
DEL SEMEN OVINO CONGELADO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
Area de Reproducción Animal

PRESENTA

Mario Alberto Acuña Aguilar

Asesores: MVZ., MSc. PhD. Everardo González Padilla  
MVZ., MSc. PhD. Javier Arriola Bueno  
Biol. MSc. PhD. Carlos Vásquez Peláez

TESIS CON  
FALLA LE CRIGEN

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1992



## **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.

## INDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	vi
INDICE DE GRAFICAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS.....	5
III. REVISION DE LITERATURA.....	6
3.1 Producción de espermatozoides.....	6
3.1.1. Influencia de la edad.....	6
3.1.2. Influencia de la época.....	8
3.1.3. Influencia del manejo.....	11
3.1.4. Influencia de la nutrición.....	12
3.2 Obtención y evaluación del semen.....	13
3.2.1. Obtención del semen.....	13
3.2.2. Evaluación del semen.....	14
3.3 Preservación y dilución del semen.....	16
3.3.1. Semen diluido fresco y refrigerado.....	16
Aditivos.....	21
3.3.2. Semen congelado.....	22
Criobiología.....	23
Osmolalidad.....	23
3.4 Inseminación artificial en la oveja.....	29
3.4.1. Tiempo de inseminación.....	29
3.4.2. Técnica de inseminación.....	30
IV. MATERIAL Y METODOS.....	35
4.1 Congelación del semen.....	33
4.2 Fertilidad del semen congelado.....	36

	Página
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
5.1 Congelación del semen.....	39
5.1.1. Tonicidad del diluyente.....	39
5.1.2. Concentración de prostaglandina.....	43
5.1.3. Tiempo de evaluación.....	47
5.2 Fertilidad del semen.....	58
VI. CONCLUSIONES.....	62
VII. LITERATURA CITADA.....	64

## INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Diluyentes evaluados .....	38
2.	Diseño del estudio de la fertilidad del semen .....	38
3.	Análisis de varianza para motilidad e integridad acrosó- mica .....	40
4.	Medias mínimo cuadráticas de los efectos principales ...	41
5.	Medias del efecto conjunto de los tres factores princi- pales sobre el porcentaje de motilidad progresiva.....	53
6.	Medias del efecto conjunto de los tres factores princi- pales sobre el porcentaje de acrosomas intactos.....	54
7.	Porcentaje de motilidad e integridad acrosómica que pre- sentó el semen ovino al descongelado en cada diluyente.	56
8.	Porcentajes de motilidad e integridad acrosómica que -- presentó el semen ovino después de 120 mins de incuba- ción a 38°C en cada diluyente.....	57
9.	Porcentaje de ovejas que no retornaron al estro y por- centaje de gestación en cada grupo.....	61
10.	Porcentaje de ovejas que no retornaron al estro y por- centajes de gestación en cada raza.....	61

## INDICE DE GRAFICAS

Gráfica		Página
1.	Efecto de la osmolalidad y de la concentración de pros- taglandina $F_{2\alpha}$ sobre la motilidad espermática.....	45
2.	Efecto de la osmolalidad y de la concentración de pros- taglandina $F_{2\alpha}$ sobre el porcentaje de acrosomas intac- tos.....	46
3.	Efecto de la osmolalidad y del tiempo de evaluación so- bre la motilidad espermática.....	48
4.	Efecto de la osmolalidad y del tiempo de evaluación so- bre el porcentaje de acrosomas intactos.....	49

5.	Efecto de la concentración de prostaglandina $F_{2\alpha}$ y del tiempo de evaluación sobre la motilidad espermática...	51
6.	Efecto de la concentración de prostaglandina $F_{2\alpha}$ y del tiempo de evaluación sobre el porcentaje de acrosomas intactos.....	52

## RESUMEN

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la crioviabilidad, integridad acrosómica y fertilidad del semen ovino, criopreservado en diluyentes isotónicos e hipertónicos suplementados con prostaglandina  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ ). Se evaluaron diez diluyentes en base a la recuperación de la motilidad espermática (MOT) y al porcentaje de acrosomas intractos (PAI) -- posdescongelado en un diseño factorial  $2 \times 5 \times 2$ . Los factores incluidos fueron: a) tonicidad; b) concentración de  $PGF_2\alpha$  y c) tiempo de evaluación. El semen se recolectó mediante vagina artificial, la dilución se realizó considerando una concentración de  $300 \times 10^6$  espermatozoides móviles/dosis antes de la congelación. El enfriamiento del semen a  $5^\circ C$  y el equilibrio del mismo se realizó en cuatro horas. El semen se envasó en pajilla francesa de 0,5 ml y se congeló en vapor de nitrógeno líquido. El descongelado se realizó en agua a  $39^\circ C$  durante 30 seg. Mediante el análisis de varianza se determinó que los diluyentes hipertónicos fueron superiores ( $P < 0,05$ ) a los isotónicos, tanto para MOT (34,9 vs 26,8%) como para PAI (47,2 vs 34,4%); que para MOT las concentraciones de  $PGF_2\alpha$  de 0, 15, 30 y 150  $\mu g/ml$ , fueron superiores ( $P < 0,05$ ) a 300  $\mu g/ml$  con 33,6, 32,2, 32,1 y 31,2 vs 25,4 respectivamente, para PAI las concentraciones de 15, 30 y 150  $\mu g/ml$ , fueron superiores ( $P < 0,05$ ) a las de 0 y 300  $\mu g/ml$ , con 44,6, 48,8 y 44,0 vs 31,5 y 35,1% respectivamente. Cuando la evaluación del semen descongelado se realizó a los 120 min de incubación a  $38^\circ C$ , se observó una disminución ( $P < 0,05$ ) en ambos parámetros y en todos los diluyentes. Se concluyó que los diluyentes más adecuados fueron los hipertó-

nicos con 30 y 150  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ya que mostraron los mejores porcentajes para MOT (38,2 y 39,5%) y para PAI (60,4 y 60,9%) respectivamente. En forma preliminar se evaluó la fertilidad del semen criopreservado en el diluyente hipertónico adicionado con 150  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , en ovejas en estro natural e inseminadas en una ocasión, obteniéndose porcentajes de no retorno al estro del 35,4 y 53,8%, y de gestación del 29,0 y 30,7% cuando el semen fue aplicado entre las 15 y 18 hrs o entre 25 y 28 hrs de detectado el estro respectivamente.

## I. INTRODUCCION

El incremento de las fuentes alimenticias para satisfacer la demanda de la población mundial, constituye un gran reto para la ganadería -- del presente. Los alimentos de alto valor proteico son cada vez más escasos. El continuo crecimiento demográfico en el mundo ha ocasionado -- que la disponibilidad per cápita de proteínas de origen animal sea muy limitada y su consumo diario esté muy por debajo del mínimo deseado. De bido a ésto, es importante considerar a la cría de ovinos como una alter<sub>n</sub>ativa viable para el abastecimiento de la población humana con proteí<sub>n</sub>as de origen animal (Reveron, 1986).

Los ovinos son sin lugar a dudas una de las especies animales más versátiles; su capacidad para convertir alimento fibroso de bajo valor nutricional, no aprovechable por otras especies, en valiosos productos para el consumo humano, así como su elevada adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales, han sido características de esta especie reconocidas hace más de 10,000 años (Fitzhugh y Bradford, 1985). Además de ésto, hay que considerar otras ventajas: su tamaño pequeño, su elevada tasa reproductiva, su variedad de productos y su diversidad de genotipos, que le aseguran la continuidad de la especie y un lugar prominente dentro de la producción animal del mundo (Spillet, Bunch y Foote, 1979).

México siendo un país de grandes extensiones pastoriles con gran potencial borreguero, paradójicamente la producción ovina ocupa el último lugar en cuanto a importancia económica dentro de la producción animal del país. En la actualidad el rebaño nacional consta de aproximadamente siete millones de cabezas, y está constituido en un 95% por animales ---

criollos y el 5% restante por razas puras (Jalil, 1984), que en conjunto representan el 1.2% de la producción animal total del país; siendo - el 0.8% para carne, el 0.3% para lana y 0.1% para los subproductos como pieles y vísceras (Arbiza, 1984; De la Madrid, 1986).

Más grave aún es el hecho de que mientras la población ovina mundial va en aumento, la del país se ha mantenido prácticamente estable - desde hace 40 años, lo cual ha ocasionado un incremento sustancial en - las importaciones para satisfacer la demanda interna de carne y lana -- ovina, contribuyendo de esta manera a agravar la situación económica -- (Arbiza, 1984).

Aunque son múltiples y complejos los factores que han propiciado - el estancamiento de la producción ovina nacional, ésto no justifica el abandono científico y tecnológico en que se encuentra esta especie. En un país como México con un alto crecimiento demográfico y una población tradicionalmente desnutrida urgida de alimentos de alto valor nutritivo - es imperante el desarrollo y adaptación de tecnología pecuaria, que per - mita incrementar cualitativamente y cuantitativamente la producción ovi - na nacional.

Una de las técnicas que podría ayudar a alcanzar este objetivo es el uso de la inseminación artificial, especialmente en un país como Mé - xico, donde los carneros de alto mérito genético generalmente se locali - zan en instituciones gubernamentales y en centros de investigación ó de docencia, siendo accesibles para el pequeño productor únicamente a tra - vés del uso de esta técnica. La eficacia de la inseminación artificial ha sido plenamente demostrada en la industria lechera, "nunca antes se había logrado un mejoramiento genético tan impresionante y en tan corto tiempo, como ha sucedido en el ganado lechero debido al uso y desarro - llo de esta técnica" (Foote, 1981).

En la especie ovina se han publicado resultados exitosos con el uso de semen fresco diluido desde finales de la década de los cincuentas --- (Graham, Crabo y Pace, 1978). Sin embargo, la falta de identificación de sementales de alto mérito genético, así como la dificultad para atravesar el cérvix de la oveja durante la inseminación, son los principales factores que han limitado el uso y desarrollo de esta técnica, evitando de esta manera, que la ovinocultura se beneficie con las múltiples ventajas que ofrece la inseminación artificial. Con respecto al primer punto es mediante la utilización simultánea de un semental ovino sobresaliente en varios rebafios, a través de la inseminación artificial como semen con gelado, como se podría conocer rápidamente y con mayor precisión su patrimonio genético; mientras que para la resolución del segundo punto, -- una de las alternativas propuestas es la de formular un diluyente y desarrollar una técnica específica para esta especie, que permitan preservar la calidad de los espermatozoides, y que al mismo tiempo facilite el paso de los mismos a través del cérvix de la hembra (Colas y Courot, 1977; Edqvist et al., 1975).

De esta manera en la actualidad existen dos promisorias líneas de investigación, una de ellas estudia los efectos del uso de diferentes soluciones hipertónicas en los diluyentes para congelar semen ovino, sobre la crioviabilidad y fertilidad espermática (Fiser, Ainsworth y Langford, 1981; Fiser, Ainsworth y Fairfull, 1982; Fiser y Fairfull, 1986); mientras que la otra, con base en los mismos parámetros, estudia el efecto de la adición de prostaglandinas en los diluyentes para congelar dicho semen (Edqvist, Einarsson y Gustafsson, 1975; Gustafsson, Edqvist y --- Einarsson, 1975; Gustafsson et al., 1977; Gustafsson, 1978; Memon et al. 1984). Ambas líneas de investigación han publicado, en forma indepen---

diente, resultados por demás alentadores, sin embargo, la cantidad de - espermatozoides por dosis de inseminación continua siendo alta, disminuyendo así, tanto la eficiencia del semental como la de la técnica misma.

Por lo expuesto y debido a la falta de información al respecto, es importante estudiar ambas líneas de investigación en forma conjunta, para tratar de reducir la concentración espermática por dosis de inseminación sin menoscabo de la fertilidad.

## II. OBJETIVOS

1.- Determinar el efecto de la adición de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en diferentes concentraciones, a diluyentes a base de leche descremada isotónicos e hipertónicos para congelar semen ovino, sobre la crioviabilidad espermática y la integridad acrosómica de los espermatozoides al descongelado.

2.- Determinar la fertilidad de dicho semen, cuando se utiliza para inseminación artificial en dosis reducidas.

### III. REVISION DE LITERATURA

#### 3.1. Producción de espermatozoides

La fertilidad de la oveja depende en gran medida de la producción - espermática del carnero; un número elevado de espermatozoides de alta calidad es requisito para gestar a la hembra, ya sea mediante monta natural o a través de la inseminación artificial (Colas y Courot, 1977). La cantidad y calidad de los espermatozoides están determinadas por la producción de gametos a nivel testicular, su maduración a través del epidídimo y la intensidad de actividad sexual del carnero, lo cual a su vez - está influenciado principalmente por factores tales como la edad, la época del año en las razas estacionales, el nivel nutricional y el manejo - del animal (Courot, 1979).

##### 3.1.1. Influencia de la edad

La espermatogénesis en los corderos comienza entre los tres y cuatro meses de edad, y es concomitante a un acelerado crecimiento testicular (Skinner et al., 1968). No obstante debido a la degeneración celular que ocurre durante los primeros ciclos, a la duración del proceso y al tránsito a través del epidídimo, los primeros espermatozoides pueden colectarse a partir de los cinco o seis meses de edad (Courot, Hoche---reaue y Ortavant, 1970), existiendo diferencias entre razas (Skinner y Rowson, 1968), y dentro de razas, ya sea por su precocidad genética como por efectos ambientales tal como lo es el peso corporal (Dyrmondsson, 1972).

De acuerdo a Hulet y Shelton (1980), los corderos pueden servir y gestar a las hembras, cuando éstos han alcanzado un peso corporal entre

el 40 y 60% de su peso adulto aunque las tasas de fertilidad son bajas; Courot (1979) mostró que los corderos producen eyaculados con fertilidad normal entre los 7.5 y 9 meses de edad, siendo esta variación explicada debido a la raza del animal.

El inicio de la pubertad en los corderos involucra, entre otros factores, la sincronización de la actividad secretoria entre el hipotálamo y la hipófisis, como entre los testículos y la adenohipófisis. Los principales cambios endócrinos y fisiológicos que se presentan durante este período son : 1) un cambio cualitativo en el patrón episódico de secreción de hormona luteinizante, y 2) un incremento progresivo de la sensibilidad testicular para esta hormona (Foster et al., 1978; Lincoln y Fraser, 1979).

La elevación de los niveles sanguíneos de las hormonas luteinizante y testosterona, que durante esta etapa presentan los corderos, se debe a un aumento en la frecuencia y amplitud de los picos de la primera hormona seguidos por elevaciones de los niveles de testosterona, lo cual se debe a nivel testicular, a la proliferación de células de Leydig y a la mayor cantidad de receptores para la hormona luteinizante que se observa durante la pubertad (Desjardins, 1981). Asimismo Skinner et al. (1968), mencionaron que el peso testicular en los corderos está relacionado positivamente con el contenido hormonal y peso de la hipófisis.

La producción espermática aumenta con la edad y es probable que se deba a la multiplicación de espermatogonias de "reserva" ( $A_0$ ); y a su diferenciación a espermatogonias  $A_1$  las cuales, a través de los ciclos espermatogénicos, dan origen a los espermatozoides (Garner y Hafez, 1980). De igual forma la calidad espermática mejora con la edad, al volverse -- más eficiente tanto la espermatogénesis con el desarrollo testicular, co

mo la maduración del espermatozoide en el epidídimo debida al incremento de la secreción de andrógenos (Colas y Courot, 1977).

### 3.1.2. Influencia de la época

En latitudes de norte y sur el carnero presenta un comportamiento sexual estacional, controlado básicamente por el fotoperíodo a través de la glándula pineal (Turek y Campbell, 1979; Bittman, Karsch y Hopkins, 1985). De igual forma el proceso espermatogénico está influenciado por el fotoperíodo, obteniéndose los mejores eyaculados cuando éste disminuye.

En los corderos el efecto del fotoperíodo, ya sea inhibitorio o estimulador, se manifiesta solamente después de alcanzada cierta edad. Aunque existen diferencias entre razas debido a que algunas son más estacionales que otras (Colas y Courot, 1977), generalmente este efecto se observa después de las 20 semanas de edad, por lo cual a partir de esta edad, la producción espermática depende del desarrollo corporal del animal y del fotoperíodo en que éste se encuentre (Alberio y Colas, 1976).

En el carnero, la disminución del fotoperíodo estimula la síntesis y liberación de gonadotropinas, dando por resultado, un incremento en la producción de espermatozoides y de la secreción de testosterona; este aumento de andrógenos estimula a su vez a las glándulas accesorias y modifica el comportamiento sexual del animal (Davies, Main y Setchell, 1977). En forma contraria, el aumento del fotoperíodo induce la caída del peso testicular y de las reservas espermáticas gonadales y extragonadales, debido a un proceso degenerativo en la espermatogénesis (Courot, 1979).

La calidad del semen es afectada por el fotoperíodo en menor grado que la cantidad, sin embargo, durante los meses con más horas-luz, se ha observado que la motilidad y la concentración espermática así como la fertilidad disminuyen, mientras que el porcentaje de células anormales y la mortalidad embrionaria aumentan en relación a los meses con menos horas-luz (Ott y Memon, 1980).

Con respecto a la fertilidad del semen fresco-diluido, ésta no parece estar afectada por el fotoperíodo, no obstante esto podría estar sobrestimado, ya que para la inseminación artificial se utilizan los mejores eyaculados (Colas, 1975b). En cuanto al semen congelado, éste presentó una menor capacidad fertilizante cuando fue colectado durante los meses con mayor fotoperíodo (Colas y Brice, 1976). Recientemente Fiser y Fairfull (1983) observaron que el porcentaje de motilidad espermática y la tasa de motilidad progresiva al descongelado fueron mayores cuando el semen fue colectado durante fotoperíodos decrecientes.

El efecto de la ganglionectomía del ganglio cervical superior, pinealectomía o de la aplicación exógena de melatonina sobre las características cuantitativas y cualitativas del semen ovino, aparentemente no ha sido estudiado o al menos publicado; no obstante se podría inferir subjetivamente sobre este aspecto, a partir de los pocos estudios que han considerado los cambios hormonales y del diámetro testicular que presentaron los carneros, cuando fueron sometidos a algunos de estos tratamientos. De esta manera Lincoln (1979) observó que carneros ganglionectomizados no respondieron adecuadamente a los cambios del fotoperíodo, ya que mantuvieron niveles relativamente elevados de gonadotropinas, testosterona y buen desarrollo testicular durante las 96 semanas que duró el estudio. El efecto de la pinealectomía sobre los patrones

hormonales demostró que los niveles basales de prolactina fueron elevados durante el otoño en los animales tratados, mientras que en el grupo control estos disminuyeron; que el grupo tratado no presentó cambios estacionales en la secreción de hormona luteinizante, no así el grupo control, el cual presentó cambios estacionales en la frecuencia de picos secretorios, siendo más elevados durante el otoño. El pico de hormona felículo estimulante que presentó el grupo control durante el otoño no se observó en el grupo tratado; los niveles de testosterona no mostraron diferencias ni entre los grupos ni entre las estaciones (Kennaway et al., 1981).

Lincoln y Ebling (1985) estudiaron el efecto de la aplicación constante de melatonina exógena mediante implantes subcutáneos, y observaron que con la aplicación de melatonina durante los días largos, el carnero responde como en días cortos, reasumiendo su desarrollo y actividad sexual, pero si el tratamiento se prolonga por varios meses, los testículos involucionan espontáneamente ya que se vuelven refractarios al efecto de los días cortos, lo cual probablemente se deba, a la existencia de un ciclo circanual que asegura la reproducción de esta especie.

Otro de los estímulos ambientales que afectan a la espermatogénesis es la temperatura. Los testículos requieren de una temperatura menor a la corporal para funcionar eficientemente, por lo cual las características anatómicas de éstos y del escroto permiten regular hasta --- cierto punto la temperatura testicular (Rathore, 1970).

La fertilidad del carnero disminuye en temperaturas elevadas, lo cual probablemente se deba a alteraciones del proceso espermático, ya que se ha demostrado que la exposición del carnero a temperatura de ---

45°C por más de cuatro días , produce una disminución de la motilidad y concentración espermática, mientras que el número de espermatozoides -- muertos y el porcentaje de anomalías aumenta, siendo las más frecuentes: gotas proximales, cabezas piriformes (Phillips et al., 1943; --- Ashok y Rathore, 1969; Ashok y Rathore, 1970) y acrosomas anormales (Rathore, 1970) regresando a la normalidad a los 33 días de terminado el - tratamiento. Hernández et al. (1982) quienes estudiaron una raza tropical, también observaron que las características seminales tales como la concentración, la motilidad espermática y el porcentaje de anomalías fueron afectadas por temperaturas elevadas.

La longitud de la lana escrotal también repercute en la fertilidad así los porcentajes de pariciones de borregas empadradas con carneros - con lana escrotal hasta de 1.0 cm, de 1.0 a 2.5 cms y de 5.0 a 7.5 cms- fueron del 79.3, 84.9 y 59.2% respectivamente, lo cual se debió a una - inadecuada regulación térmica por el escroto (George, 1969).

### 3.1.3. Influencia del manejo

El carnero es capaz de producir espermatozoides durante todo el -- año, independientemente de su raza o ubicación geográfica. Sin embargo la cantidad de espermatozoides que puede almacenar en el ampulla y en la parte distal de la cola del epidídimo es limitada, de tal suerte que el número total de espermatozoides/eyaculado disminuye al aumentar la frecuencia de colecciones o de servicios/día (Salamon, 1976) comprometién do así la fertilidad en la hembra. Esto es especialmente cierto en ovejas con estro inducido mediante tratamientos hormonales, ya que en tal situación, es necesaria una cantidad mayor de espermatozoides para gestar a la hembra (Hawk y Conley, 1975).

edad más temprana y con mayor peso que aquellos mantenidos con niveles bajos de nutrición (Ott y Memon, 1980).

En cuanto a los animales adultos, se ha propuesto una sobrealimentación protéica antes de la época reproductiva, con el objeto de aumentar la cantidad espermática y la libido (Salamon, 1964). En forma contraria, Braden et al. (1974) no encontraron efecto de la suplementación protéica sobre la producción diaria de espermatozoides, sin embargo, la suplementación energética o energética más protéica incrementó significativamente en 26.0 y 71.2% respectivamente la producción espermática diaria.

### 3.2. Obtención y evaluación del semen

#### 3.2.1. Obtención del semen

Los métodos comúnmente utilizados para la obtención del semen en los carneros son : el de vagina artificial y el de la estimulación eléctrica o electroeyaculación, observándose diferencias entre ambos métodos en cuanto a la cantidad y calidad espermática del eyaculado.

Algunos estudios (Mattner y Voglmayr, 1962; Salamon y Marrant, -- 1963) mostraron que los eyaculados obtenidos mediante electroeyaculación presentan mayor volumen y menor concentración espermática, en relación a aquellos obtenidos mediante vagina artificial. Hernández, Rodríguez y González (1976) evaluaron ambos métodos en carneros Pelibuey, y no observaron diferencias en cuanto al volumen o al porcentaje de espermatozoides anormales; no así con respecto a la concentración espermática, la cual fue superior utilizando la vagina artificial,

En cuanto a la calidad del semen, se ha observado que además del riesgo que existe de contaminar el eyaculado con orina cuando se usa el electroeyaculador, tanto la fracción espermática como el plasma seminal

presentan una mayor concentración de sodio y potasio (Quinn y White, --- 1966). Se ha publicado también, que con el uso de este método, los espermatozoides presentan una menor resistencia al choque por enfriamiento así como una menor tasa de sobrevivencia espermática al descongelado (--- Entwistle y Martin, 1972). Por otro lado, Salamon y Marrant (1963) observaron un incremento del 17% en la fertilidad a favor de la vagina artificial, al comparar ambos métodos entre sí. Contrariamente, estudios posteriores (Lapwood, Marin y Entwistle, 1972; Hackett y Wolynetz, 1982) mostraron que la fertilidad no es afectada por el método de colección.

### 3.2.2. Evaluación del semen

La evaluación del semen se realiza con el objeto de examinar al carnero, así como el de seleccionar los eyaculados que tienen mayor posibilidad de gestar a la hembra. Se han desarrollado muchas pruebas para -- evaluar las características cuantitativas y cualitativas del semen, desafortunadamente cuando los parámetros evaluados se consideran en forma -- independiente, ninguno de éstos por sí solo, son predictores exactos de la fertilidad (Foote, 1982). Más aún, quizá con excepción de la integridad acrosómica, los coeficientes de correlación entre la fertilidad y -- los parámetros evaluados han sido bajos (Saacke, 1972; Foote, 1984). Es to se debe a la gran variabilidad o error de muestreo causado por las características intrínsecas del animal, el manejo del mismo al momento de -- la colección, y por la habilidad del técnico para manejar la muestra colectada (Foote, 1984), de allí que se realice la evaluación de varios parámetros debidamente combinados, y considerarlos en forma conjunta (Ott y Menon, 1980).

La cantidad de espermatozoides en el eyaculado se determina mediante la evaluación de dos parámetros : 1) volumen del eyaculado y 2) con--

centración espermática/ml, ambos parámetros son estimadores eficientes - del estado que guarda la espermatogénesis, y puede estimarse fácil, rápida y objetivamente si se cuenta con el equipo adecuado y técnicos capacitados (Foote, 1975; Salamon, 1976; Ott y Memon, 1980).

En cuanto a la calidad espermática, se han desarrollado varias pruebas con el objeto de predecir la fertilidad del semen; dentro de las más importantes y ampliamente usadas se encuentran las de motilidad espermática, la de morfología celular y recientemente la de morfología acrosómica. Las primeras de ellas se basan en apreciaciones subjetivas del parámetro a evaluar, ya sea el porcentaje de motilidad espermática y/o la tasa de motilidad espermática progresiva, las cuales se evalúan rutinariamente en semen fresco, fresco diluido, refrigerado y en semen descongelado (Salamon, 1976; Colas y Courot, 1977).

Con respecto a la morfología celular, el carnero a diferencia de -- otras especies presenta mayor cantidad de espermatozoides anormales (Foote, 1982), sin embargo, esto parece ser una característica propia de la especie, ya que la fertilidad no se ve comprometida, a menos que el porcentaje de células anormales sea superior al 20% (Foote, 1980).

Es importante evaluar tanto la motilidad espermática como la morfología celular del eyaculado, ya que no existe correlación entre ciertas anomalías y la motilidad. Esto quiere decir que pueden obtenerse eyaculados con buena motilidad pero con un elevado número de células -- anormales, lo cual comprometería la fertilidad. Este tipo de eyaculados se presenta con mayor frecuencia fuera de la época reproductiva (Islam y Land, 1977).

La evaluación de la morfología acrosómica como porcentaje de acrosomas intactos se realiza en semen fresco, diluido y descongelado y es en

la actualidad, una de las pruebas cualitativas que más importancia ha cobrado, ya que se ha observado que este parámetro, en semen descongelado, está positivamente correlacionado con fertilidad en el toro (Saacke y White, 1972), y en el carnero (Smorag y Kareta, 1974; en Colas y Courrot, 1977). Asimismo se ha publicado que el acrosoma del espermatozoide ovino es más susceptible que el del bovino (Watson y Martin, 1972) al daño causado por los procesos de dilución, enfriamiento, almacenamiento, congelación y descongelación (Jones y Martin, 1973; Tasserón, Amir y Schindler, 1977).

### 3.3. Preservación y dilución del semen

#### 3.3.1. Semen diluido fresco y refrigerado

El éxito alcanzado por la inseminación artificial se debe en gran medida, al desarrollo de técnicas y soluciones que han permitido mantener durante horas, días y aún años la capacidad fertilizante de las células espermáticas.

Los espermatozoides del ovino, al igual que los de otras especies, se han podido preservar a distintas temperaturas (35, 15 ó 5°C) mediante la simple dilución del semen. No obstante, a pesar de que con el uso de semen refrigerado en la inseminación artificial se han obtenido elevadas tasas de fertilidad, el relativo poco tiempo que pueden preservarse los espermatozoides en esta forma, ha sido el factor limitante para su aplicación a gran escala (Gustafsson, 1978; Langford *et al.*, 1979).

El enfriamiento del semen tiene por objeto preservar la capacidad fertilizante de los espermatozoides mediante la disminución del metabolismo celular, a partir del hecho de que la tasa metabólica es directamente proporcional a la temperatura absoluta del medio. De esta forma, los procesos químicos intracelulares se retrasan, prolongando así la vi-

da de los espermatozoides. No obstante, aún a temperatura de 5°C el metabolismo, aunque reducido, continúa, presentándose cambios internos y - externos que son perjudiciales para el espermatozoide hecho por el cual, la fertilidad disminuye en pocos días o en pocas horas si el semen fue - enfriado a temperatura de 15°C (Foote, 1978).

El plasma seminal contiene agentes que preservan la fertilidad es--permática durante períodos relativamente cortos, por lo que es necesario agregar al semen soluciones que : 1) alarguen las propiedades del plasma 2) protejan a los espermatozoides de los daños inherentes al proceso de enfriamiento y 3) que aumenten el volumen total del eyaculado, permitien--do así incrementar el número de inseminaciones. A estas soluciones se - los conoce como diluyentes seminales (Salamon, 1976).

Las propiedades que debe tener un buen diluyente para semen ovino - han sido descritas por varios autores (Salamon, 1976; Ott y Mamon, 1980) y son prácticamente las mismas resumidas por Salisbury y VanDemark (1961) para los diluyentes de semen bovino.

Varios diluyentes han sido utilizados para la preservación del se--men ovino; arbitrariamente pueden dividirse en dos grupos: 1) los que -- utilizan a la leche como ingrediente básico en su formulación y 2) los - preparados a base de yema de huevo.

La leche fresca de vaca y de oveja, así como la leche de vaca des--cremada y reconstituida han sido ampliamente utilizadas como diluyentes para semen ovino; la caseína es el agente protector que evita que los es--permatozoides sufran el choque por enfriamiento durante la disminución - de la temperatura, sin embargo, su modo de acción no ha sido establecido (O'Shea y Wales, 1966).

La leche contiene en su fracción protéica un factor antiestreptococo conocido como lactenina, el cual es perjudicial para los espermatozoides. La lactenina es irreversiblemente inactivada ya sea por la adición de compuestos con grupos sulfhídricos libres (Jones, 1969) o por calentamiento a temperaturas superiores a la de pasteurización ; cuando la leche es calentada a esta temperatura, se activan los grupos sulfhídricos de la  $\beta$ -lactoglobulina anulando la toxicidad de dicho factor (Johnson, Flipse y Almquist, 1955; en Jones, 1969).

Se han obtenido resultados satisfactorios en cuanto a motilidad espermática y a fertilidad, cuando la leche ha sido utilizada para diluir semen ovino, sin embargo, hay que considerar que son múltiples los factores que interactúan con el diluyente tales como : la tasa de enfriamiento, dosis espermática, número de inseminaciones, tiempo de inseminación, tipo de estro (natural o inducido), etc. y que esta compleja influencia puede explicar la gran variación, y en ocasiones la total contradicción de algunos resultados publicados.

De esta manera, Jones (1969) observó que los porcentajes de motilidad espermática a 37° y 5°C en los diluyentes de leche de vaca descremada, fueron superiores a los de leche de oveja 55.0 vs 16.0% y 50.0 vs 42.5% respectivamente. Tiwari, Srivastava y Sahni (1977) publicaron que el semen ovino enfriado a 5°C en leche de vaca durante 24 horas, presentó porcentajes de motilidad del 50%, mientras que en el semen sin diluir no se observó motilidad alguna.

En cuanto a la fertilidad, Sahni y Tiwari (1973) no encontraron diferencias al comparar los porcentajes de pariciones, al utilizar semen diluido en leche de vaca o en leche de oveja mantenido a 35°C (40.1 vs 38.3%) a 12°C (17.3 vs 22.0%). Lapwood, Martin y Entwistle (1972) ob-

tuvieron un 47.6% de pariciones, al utilizar semen ovino diluido en leche de vaca y mantenido a 30°C hasta 35 min después de su colección; la concentración fue de  $50 \times 10^4$  espermatozoides. Smith, Boland y Gordon (1978) obtuvieron un 70% de pariciones al utilizar semen diluido en leche descremada e incubado durante 3-4 hrs, para inseminar ovejas con estro sincronizado y 500 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) y utilizando una concentración de  $400 \times 10^6$  espermatozoides.

Martínez, Rufz y Castillo (1979) obtuvieron un 88% de no retorno al estro, en ovejas Pelibuey inseminados con semen refrigerado y diluido en leche de vaca reconstituida, la concentración espermática fue de  $200 \times 10^6/0.2$  ml. Hernández, Hernández y Rufz (1982) en un estudio similar al anterior pero con concentraciones espermáticas menores ( $160 \times 10^6$ ), obtuvieron un 63% de no retorno al estro. Langford, Ainsworth y Wolynetz (1982) publicaron 65% de pariciones, en ovejas con estro sincronizado e inseminadas a las 54-56 hrs de retirar las esponjas, con semen diluido en leche descremada de vaca y mantenido a 15°C, la concentración espermática fue de  $450 \times 10^6/0.5$  ml. Posteriormente, Langford, Marcus y Batra (1983) en un estudio similar al anterior pero aplicando 500 UI de PMSG al retirar las esponjas, incrementaron en un 9% el porcentaje de pariciones al aplicar semen diluido en leche descremada a ovejas Romney y Marsh.

El uso de la yema de huevo en los diluyentes para semen ovino se remonta hacia finales de la década de los años treinta, cuando Lardy y Phillips (1939) determinaron que la inclusión de la yema de huevo en el diluyente para semen ovino prolongaba la sobrevivencia de los espermatozoides refrigerados. La actividad protectora de este ingrediente parece radicar en las proteínas de alto peso molecular (Watson y Martin, 1973), o en la fracción lipoprotéica de baja densidad (Watson y Martin, 1975),

ya que mediante un posible mecanismo de adhesión a la membrana celular, se protege a los espermatozoides del choque por enfriamiento durante la disminución de la temperatura.

Watson y Martin (1973) observaron que el incrementar el porcentaje de yema de huevo en el diluyente fue benéfico para preservar la motilidad espermática pero detrimental para la integridad acrosómica, hecho - por el cual se podría explicar baja fertilidad obtenida por otros autores al utilizar semen enfriado en este tipo de diluyentes. Barua, Saha ni y Pant (1981) observaron que el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen diluido en yema de huevo-citrato de sodio, disminuyó del -- 62.3% al 43.5% después de 24 hrs. de refrigeración a 7°C.

En cuanto a la fertilidad Watson y Martin (1976) obtuvieron 27.1% de no retorno al estro, al inseminar ovejas con semen diluido en yema de huevo-glucosa y refrigerado durante 24 hrs, la concentración espermática aplicada fue de  $100 \times 10^6 / 0.1$  ml. En contraste, Zlatarcv (1976) - publicó 67% de pariciones al inseminar ovejas con semen diluido en yema de huevo-citrato de sodio mantenido a 5°C durante 24 hrs, y en concentraciones de  $80 \times 10^6 / 0.2$  ml espermatozoides. Hackett y Wolynetz (1982) obtuvieron un 9% de pariciones en ovejas con estro sincronizado e inseminadas con semen diluido en yema de huevo-lactosa-glicerol a las 48-60 hrs de retirar las esponjas, y mantenido a 5°C durante 36 hrs, mientras que en aquellas que se aplicó 500 UI de PMSG al retirar la esponja obtuvieron 34% de fertilidad.

Por otro lado, se han publicado resultados contradictorios al comparar entre sí a los diluyentes a base de leche y los de yema de huevo: Chandra y Ramamohana (1980) determinaron en base al porcentaje de motilidad del semen mantenido a 5°C durante 72 hrs, que los diluyentes de -

leche y yema de huevo-Tris fueron superiores a yema de huevo-citrato de sodio (58.5, 57.3 y 47.3% respectivamente).

Al considerar la fertilidad, Amir et al. (1973) no observaron diferencias en cuanto al porcentaje de pariciones, al comparar a la yema de huevo con la leche, utilizando semen mantenido a 25-30°C hasta 30 min - después de haber sido colectado. Trejo et al. (1985) al comparar los -- porcentajes de pariciones del semen diluido en yema de huevo o en leche y mantenido a 5°C durante 24 hrs, obtuvo resultados a favor del primero cuando la concentración fue de  $200 \times 10^6 / 2$  ml espermatozoides, mientras que al incrementar la concentración y el volumen de la dosis, los resultados favorecieron a la leche. Colas y Courot (1977) resumieron los resultados obtenidos por Colas et al. (1968) y Colas (1975a) quienes observaron que el porcentaje de pariciones en ovejas inseminadas con semen diluido en yema de huevo o en leche, y mantenido a 15°C hasta por - 15 hrs, favoreció a este último, tanto en estro natural (75.4 vs 66.4%) como en estro sincronizado (54.6 vs 38.3%).

Aditivos. Con el objeto de incrementar la fertilidad del semen -- ovino diluido, se le han añadido al diluyente distintas sustancias o -- agentes tales como catalasa (Amir et al., 1973), fentobarbital sódico - (Fiser y Langford, 1981) y prostaglandinas (Dimov y Georgiev, 1977). - Los resultados obtenidos con el uso de los primeros han sido poco alentadores; no así con la adición de prostaglandinas que parece ser una al ternativa viable para incrementar la fertilidad. De esta manera, estudios realizados por Edqvist et al. (1975) demostraron que la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (PGF<sub>2α</sub>) incrementa la contractilidad del cérvix de la oveja in vitro. Estudios posteriores de Marley et al. (1976), mostraron que la adición de las cinco prostaglandinas seminales, en concentraciones has

ta cinco veces mayores a las encontradas normalmente en el semen ovino, no tuvo efectos adversos ni sobre el metabolismo y la motilidad espermática, ni sobre la integridad acrosómica del semen diluido en yema de --huevo mantenido a 39°C durante 4 hrs o refrigerado a 5°C durante 48 hrs. Recientemente Daader y Taha (1984) publicaron que la adición de hasta --12.5 µg/ml de PGF<sub>2α</sub> al diluyente de yema de huevo-citrato, mejoró la motilidad espermática del semen mantenido a 37°C durante 225 min, sin embargo, cuando el semen fue mantenido a 5°C durante 120 hrs no se observó este efecto.

En cuanto a la fertilidad, Dimov y Georgierv (1977) observaron que la adición de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> al semen ovino, diluido y mantenido a 37°C, - en cantidades similares al total encontrado en un eyaculado (50 µg y 5µg respectivamente), incrementó en casi un 15% la fertilidad de los carne--ros.

### 5.3.2. Semen congelado

A pesar del sustancial progreso logrado durante la década pasada en cuanto a la criopreservación del semen ovino y a la inseminación artificial en esta especie, persiste la necesidad de depositar un número elevado de espermatozoides de alta calidad, capaces de poblar y atravesar el cérvix de la oveja para obtener tasas aceptables de fertilidad, lo cual disminuye marcadamente la eficiencia de esta técnica (Langford et al., -1979; Colaş y Guerin, 1981).

Debido a ésto, la investigación se ha centrado en la obtención de - mayor cantidad y calidad espermática, a través del desarrollo de diluyen--tes y de la optimización de los procesos de congelación y descongelación con el objeto de incrementar la eficiencia de la inseminación artificial en esta especie.

Criobiología. Durante varios años el semen se preservó a temperatura de refrigeración, con excelentes resultados en cuanto a fertilidad, pero es hasta 1949 cuando Polge, Smith y Parkes descubren en forma fortuita, la acción protectora del glicerol durante el congelamiento del semen bovino, hecho que dió origen a la criobiología moderna (Foote, 1982) e impulsó el desarrollo y uso de semen criopreservado en la inseminación artificial.

Sin embargo, a pesar de los avances logrados a la fecha, cuando una población no seleccionada de espermatozoides es sometida al estrés de la congelación y descongelación, se ha estimado que aproximadamente el 50% de éstos mueren o se vuelven inmóviles. Las teorías que intentan explicar el daño celular debido a este proceso se apoyan en : 1) la formación intracelular de cristales de hielo, lo que afecta la organización y estructura física del espermatozoide; 2) el incremento de la concentración de solutos intra y extracelulares conforme el agua se congela, y 3) la interacción de ambos eventos (Nath y Patt, 1970; Pickett y Berndtson, 1978).

La principal consecuencia físico-química de la congelación es el aumento de la concentración de solutos en el líquido residual, a medida que el agua es removida de la solución para formar cristales de hielo. Estos eventos y sus efectos sobre las células están influenciados, entre otros factores, por la osmolalidad del diluyente (Pickett y Berndtson, 1978).

Osmolalidad. Los diluyentes son soluciones, y como tales, presentan propiedades físico-químicas específicas que hay que considerar cuando se utilizan para congelar células vivas, como es el caso de los espermatozoides. De esta manera, las soluciones se componen del solvente y -

el soluto; cuando la cantidad de este último varía, las cuatro propiedades físicas (coligativas) de la solución se alteran en relación lineal a la concentración, así cuando ésta aumenta, la presión osmótica se incrementa, el punto de congelación y la presión de vapor disminuyen, mientras que el punto de ebullición se eleva.

El Osmol (Osm) es la unidad utilizada para medir la concentración de partículas osmóticamente activas en solución y equivale al peso molecular de la sustancia expresado en gramos. Cuando se preparan soluciones, se emplean comúnmente dos formas para expresar la concentración de éstas: 1) solución osmolar, cuya relación soluto:solvente está expresada en peso:volumen, y 2) solución osmolal, cuya relación soluto:solvente está expresada en peso:peso.

La concentración osmolal de una sustancia en un líquido se mide por el abatimiento del punto de congelación (o crioscópico) de la solución y se ha demostrado que un Osmol de soluto no ionizable ( $6.0224 \times 10$  moléculas) disuelto en un kilogramo de agua, abate el punto de congelación en  $1.858^{\circ}\text{C}$ , mientras que un Osmol de soluto ionizable lo abatirá en aproximadamente esta cantidad por cada ión en que la molécula se disocia; esto es una constante para soluciones acuosas diluidas dentro de un rango biológico, y se le conoce como Constante de Depresión Molal.

El término tonicidad se usa para describir la presión osmótica real de una solución, tomando como referencia a la del plasma sanguíneo, así, una solución isotónica es aquella que ejerce la misma presión osmótica que el plasma, mientras que aquellas que ejercen una mayor o menor presión osmótica que el plasma, se conocen como soluciones hipertónicas o hipotónicas respectivamente (Ganong, 1982; Chang, 1986).

La investigación sobre la criopreservación del semen ovino durante los primeros años, se apoyó en los principios y técnicas desarrolladas para congelar semen bovino (Visser, 1974), así los diluyentes utilizados fueron soluciones isotónicas o ligeramente hipertónicas, contándose dentro de los más populares aquellos que incluyen parcial o totalmente a la leche calentada de vaca y al glicerol.

First et al. (1961) obtuvieron hasta el 47% de motilidad al descongelado, al utilizar leche entera homogenizada más 8.5% de glicerol, además observaron, que la adición de yema de huevo en estos diluyentes no mejoró la motilidad espermática posdescongelado. Jones (1969) observó que los espermatozoides diluidos en leche descremada sobrevivieron mejor al descongelado que en un diluyente sintético a base de lactosa 27.5 vs 13.5%. Colas (1975b) al comparar a la leche con la yema de huevo-lactosa, en base a la motilidad posdescongelado, obtuvo resultados a favor de la primera (37.0 vs 35.9%). Contrariamente, Hinshelwood et al. (1980) al comparar a la leche con la yema de huevo-Test, en base a la motilidad progresiva y a la liberación de transaminasas glutámico-oxaloacéticas, obtuvieron resultados a favor de esta última 5.4 vs 18.4% y 98.9 vs 66.5 UI/ml respectivamente.

Al evaluar la fertilidad First, Sevinge y Henneman (1961) obtuvieron 17% de pariciones al utilizar a la leche como diluyente, mientras que al utilizar leche-yema de huevo obtuvieron el 30% de pariciones, siendo la concentración espermática ligeramente mayor en este último 75 vs 81 x 10<sup>6</sup> Colas (1975b) al comparar a la leche descremada reconstituida con la yema de huevo-lactosa, observó 73.5 vs 42.2% de concepciones respectivamente. Langford et al. (1979) al utilizar un diluyente que incluía yema de huevo-lactosa-leche-citrato de sodio, obtuvieron 43% de pariciones en --

ovejas con estro sincronizado, y aplicación de 500 UI de PMSG al retirar las esponjas e inseminación artificial a las 54 y 60 hrs. Tung-Yung Lin (1980) no encontró diferencias en cuanto a los porcentajes de concepción al comparar ocho diluyentes a base de yema de huevo, aunque observó una tendencia a favor del que incluyó a la leche como ingrediente. Al comparar a la leche con la yema de huevo-Tris, Olafsson (1980) no encontró diferencias en cuanto a los porcentajes de gestación 44.2 vs 46.6% respectivamente.

Los diluyentes que incluyen a la yema de huevo-citrato de sodio-carbohidrato y glicerol fueron ampliamente utilizados hasta finales de los años sesentas, con resultados de fertilidad que van de pobres a modestos. Salamon (1970) observó 28.6% de motilidad en semen descongelado e incubado durante seis horas a 38°C. cuando utilizó yema de huevo-citrato de sodio-rafínosa. Lighfoot y Salamon (1970ab) y Salamon y Lighfoot (1970) - en una serie de estudios al utilizar dicho diluyente, obtuvieron inicialmente el 26% de pariciones, posteriormente al optimizar el proceso de congelación y descongelación, obtuvieron hasta el 64.7%, resultados que fueron confirmados por Salamon (1971) 54.9%, Salamon (1972) 52.9% y Salamon y Visser (1974) 54.5%. Smirnov et al. (1978) obtuvieron 31.3 y 39.8% de concepciones al inseminar ovejas en una o dos ocasiones respectivamente, con semen congelado en yema de huevo-citrato de sodio-rafínosa-ácido glutámico.

Al sustituir a la rafínosa con glucosa, Kalev et al. (1970) obtuvieron 24% de pariciones; al aumentar la concentración de glucosa (del 3 al 5%) Loginova y Zeltobryuh (1972) obtuvieron 32.5% de pariciones, mientras que Boureanu y Negoita (1971) publicaron 49.8% de concepciones al utilizar yema de huevo-citrato de sodio-glucosa y 7% de glicerol.

Al utilizar fructosa Luca (1968) obtuvo 45% de concepciones; Kareta, Pilch y Wierzbowski (1971) obtuvieron 48% de pariciones y Kareta et al. (1972) publicaron 50% de pariciones, mientras que al utilizar lactosa -- Platov (1968) obtuvo 24% de pariciones al utilizar una sola inseminación. Aandal y Andersen (1968) obtuvieron hasta un 62.5% de gestaciones al inseminar en dos ocasiones y Fraser (1968) publicó un 80% de no retorno al estro al inseminar ovejas en tres ocasiones durante el mismo estro.

Con este diluyente Colas et al. (1971) obtuvieron 53% de no retorno al estro, al inseminar en dos ocasiones a ovejas con estro sincronizado y 400 UI de PMSG al retirar las esponjas; posteriormente, Colas (1972) - publicó 68% de pariciones en un estudio similar al anterior, pero con doble inseminación en tiempos preestablecidos (50 y 60 hrs). Kalev, Zagorski y Zalkhariev (1971) al comparar a la lactosa con la glucosa, obtuvieron 45.4 vs 33.2% de concepciones respectivamente. Trejo (1985) obtuvo 19.4% de motilidad progresiva al utilizar lactosa y no observó diferencias en cuanto al número de anomalías al comparar el semen fresco con el congelado en este diluyente.

Con el uso del Tris para sustituir al citrato de sodio en los diluyentes para congelar semen ovino, se han obtenido resultados satisfactorios tanto en crioviabilidad espermática como en fertilidad, de esta manera, Samouilidis (1970) obtuvo hasta un 52% de no retorno al estro al utilizar yema de huevo-Tris-fructosa. Linge (1972) publicó 55% de pariciones con este diluyente, mientras que Aandal y Rougner (1975) obtuvieron un 57% de concepciones al inseminar ovejas en dos ocasiones durante el mismo estro con semen diluido en yema de huevo-Tris-fructosa.

En 1972, Salamon y Visser determinaron que la glucosa era el carbohidrato más adecuado para los diluyentes a base de yema de huevo-Tris y que la motilidad al descongelado en este diluyente fue superior 42.4 vs

57.5% que en yema de huevo-citrato de sodio-rafinosa. Apoyados en este estudio Visser y Salamon (1973) obtuvieron hasta un 57.1% de pariciones al inseminar ovejas en dos ocasiones durante el mismo estro, y en un estudio similar, Visser y Salamon (1974) lograron un 57.6% al utilizar semen reconcentrado. Salamon (1977) no observó diferencias en cuanto al porcentaje de pariciones (44.4 vs 46.2%), al inseminar ovejas en una o dos ocasiones respectivamente al utilizar este diluyente.

Mesaros, Gamcik y Sichvarc (1978) obtuvieron 49.3% de motilidad espermática posdescongelado, al utilizar yema de huevo-Tris-fructosa, y observaron que este diluyente fue superior a yema de huevo-lactosa y a yema de huevo-lactosa-rafinosa. Maxwell et al. (1980) obtuvieron un 52% de pariciones al utilizar yema de huevo-Tris-glucosa.

Orizaga, Bustamante y Valencia (1982) publicaron 54.4% y 60.4% de motilidad espermática e integridad acrosómica al descongelado respectivamente, al utilizar un diluyente que incluía al Tris. Acuña y Valencia (1982) determinaron que en base a la motilidad espermática al descongelado, los diluyentes que incluyeron Test o Tris fueron superiores a los que incluyeron citrato de sodio 21.4, 19.4 vs 16.5% respectivamente. Trejo et al. (1984) observaron 28.2% de motilidad posdescongelado y obtuvieron un 13.6% de pariciones al utilizar yema de huevo-Tris-glucosa.

Por otro lado, en los últimos años se han venido desarrollando diluyentes que parecen ser más adecuados que los anteriormente mencionados para la criopreservación del semen ovino, de esta forma, Fiser (1979) -- evaluó dos complejos diluyentes que incluyen, entre varios agentes y sustancias comúnmente utilizados en la formulación de diluyentes, a compuestos crioprotectores de alto peso molecular como el Dextran o el almidón de hidroxietil, obteniendo motilidades espermáticas al descongelado del

orden del 57.5 y 55.0% respectivamente. En 1981, Fiser, Ainsworth y --- Langford evaluaron el efecto de la osmolalidad sobre la recuperación de la motilidad espermática al descongelado, en diluyentes a base de yema de huevo y leche descremada, determinando que los diluyentes hipertónicos - fueron superiores a los isotónicos y a los hipotónicos, asimismo, al inseminar ovejas con semen congelado en un diluyente hipertónico, obtuvieron 67.5% de gestaciones.

Con base en los dos estudios anteriores Fiser, Ainsworth y Pairfull (1982) evaluaron al Dextran como sustituto o como complemento de la yema de huevo o de la leche, en diluyentes isotónicos e hipertónicos, observando una mejor recuperación de la motilidad espermática al descongelado en estos últimos.

### 3.4. Inseminación artificial en la oveja

#### 3.4.1. Tiempo de inseminación

La fertilidad del semen depende primeramente de la temperatura en - que este fue preservado, de esta forma, al hablar del tiempo de inseminación con relación al estro Amir y Schindler (1972) observaron que al utilizar semen fresco sin diluir y mantenido a 30°C hasta 30 min, se obtuvieron bajos porcentajes de fertilidad (45%) cuando la inseminación se - realizó durante las primeras cuatro horas de haberse iniciado el estro. - Mattner (1966) observó que cuando la concentración espermática en la d-- sis es menor y/o el tiempo de preservación es mayor, en el semen fresco o refrigerado, el tiempo óptimo para la inseminación se limita aún más. Lo mismo sucede cuando las ovejas se encuentran en estro sincronizado - (Robinson, 1970).

Schindler y Amir (1973) utilizando semen fresco, diluido en leche - descremada y mantenido a 25-30°C hasta 60 min, obtuvieron hasta un 711 -

de pariciones cuando la inseminación se realizó entre las 16 y 24 hrs de iniciado el estro, y una tendencia a incrementarse la fertilidad conforme aumentó la concentración espermática en la dosis. Resultados similares fueron publicados por Salamon (1976).

La necesidad de determinar el tiempo óptimo para la inseminación artificial con semen congelado ha sido mencionada por Salamon y Lighfoot (1970) y Salamon (1971), quienes demostraron que la inseminación realizada entre las 15 y 25 hrs, después de iniciado el estro fue más efectiva, con este tipo de semen, que cuando aquella se realizó entre las 1 y 15 hrs de iniciado el estro.

#### 3.4.2. Técnica de inseminación

Debido a la peculiar disposición anatómica del cérvix de la oveja la cual dificulta la inseminación intrauterina, el semen normalmente es depositado a nivel de esta estructura, no obstante, en los estudios que se han realizado con el objeto de depositar el semen en el útero, ya sea -- atravesando el cérvix o mediante cirugía, se han obtenido elevadas tasas de fertilidad; así Loginova y Zeltobryuh (1968) obtuvieron un 88 y 12% de concepciones, al depositar semen criopreservado en los oviductos o en el cérvix respectivamente. Resultados similares fueron publicados por Mattner, Entwistle y Martin (1969) al depositar quirúrgicamente semen criopreservado en el útero, más aún, obtuvieron tasas normales de fertilización, al inseminar intrauterinamente con este tipo de semen concentraciones de  $30 \times 10^6$ , o con semen fresco de  $3 \times 10^6$  espermatozoides. Posteriormente, Lightfoot y Salamon, (1970ab) obtuvieron cerca del 90% de fertilización, al inseminar en útero vía quirúrgica a ovejas con semen criopreservado, mientras que al depositar el mismo semen a la entrada del cérvix obtuvieron un 45% de fertilización. Andersen, Aamdal y Fougher (1973) deposita-

ron el semen criopreservado en el útero atravesando el cérvix y obtuvieron un 89% de concepciones, mientras que al depositar el semen en el cérvix lograron un 48% de concepciones.

Con respecto a la inseminación cervical con semen fresco Salamon -- (1976) al comparar diferentes profundidades de penetración dentro del -- cérvix, observó que cuanto mayor era la penetración mayor fue la fertilidad.

En estudios similares, pero utilizando semen criopreservado los resultados fueron contradictorios: así, Lightfoot y Salamon (1970b); Salamon y Lightfoot (1970) y Andersen, Aandal y Fougner (1973) observaron -- que mientras mayor era la penetración menor era la fertilidad. Contrariamente, Kareta, Pilch y Wierzbowski (1972) observaron que cuanto más -- profunda era la inseminación mayor era la fertilidad.

Se ha intentado también facilitar el paso del cateter de inseminación y de los espermatozoides a través del cérvix de la oveja mediante -- el uso de hormonas, tales como : la oxitocina (Lightfoot y Salamon, 1970 ab) y la relaxina (Salamon y Lightfoot, 1970) pero los resultados fueron desalentadores, sin embargo, con el uso de prostaglandinas, ha sido posi -- ble incrementar la fertilidad del semen ovino criopreservado. De esta -- forma, Edqvist, Einarsson y Gustafsson (1975) y Gustafsson et al. (1977) observaron que la aplicación intramuscular de prostaglandina F<sub>2α</sub> en oveja; -- así como la suplementación del semen antes de su congelación con prostaglandinas, mejoró el transporte espermático a través del tracto genital -- de la hembra.

Gustafsson, Edqvist y Einarsson (1975) obtuvieron un 70% de fertilidad al inseminar ovejas con semen criopreservado y suplementado con 300 -- µg/ml de semen de prostaglandina F<sub>2α</sub>, mientras que al utilizar el mismo

semen pero sin prostaglandinas obtuvieron un 30% de fertilidad. Gustafsson et al. (1977) concluyeron que la adición de prostaglandina E<sub>1</sub> y F<sub>2α</sub> al precongelado, en cantidades mayores (hasta 2 y 20 veces respectivamente) a las normalmente encontradas en el eyaculado del carnero, no tuvo efectos adversos ni sobre la motilidad espermática ni sobre la integridad acrosómica posdescongelado. Recientemente, Memon et al. (1984) concluyeron que la adición de prostaglandinas E y F hasta 300 μg/ml de semen antes de la congelación, no tuvo efectos detrimentales sobre la motilidad espermática al descongelado.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Congelación del semen

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Inseminación Artificial y Reproducción Animal en Ajuchitlán, Qro., durante los meses de julio y agosto de 1985. Se utilizaron seis carneros adultos de la raza Merino Australiana, los cuales durante las pruebas de selección previas al inicio del estudio, presentaron eyaculados con una motilidad progresiva inicial no menor al 70%; concentración espermática mínima de  $3.5 \times 10^6$ ; un 15% como máximo de anomalías totales; integridad acrosómica no menor al 80% y una recuperación de la motilidad al descongelado no menor al 10%.

El semen se obtuvo mediante vagina artificial, utilizando como maniqué a una borrega ovariectomizada; los eyaculados se colectaron una vez a la semana, uno por cada carnero, durante las seis semanas que duró el estudio. A cada eyaculado se le determinó el volumen, la concentración espermática con el hemacitómetro, y la motilidad progresiva inicial como porcentaje. Cada eyaculado fue diluido inicialmente a 35°C en 1.5 volúmenes de una solución compuesta de 80% (v/v) lactosa (321mM) y 20% (v/v) de yema de huevo, y se enfriaron hasta alcanzar una temperatura de 5°C en aproximadamente dos horas. A esta temperatura se les añadió la cantidad necesaria de la solución anterior, para obtener una concentración de  $300 \times 10^6$  / 0.5 ml espermatozoides móviles antes de la congelación.

A partir de este paso los eyaculados se mezclaron para manejarse en conjunto, el cual se dividió en dos fracciones diluidas cada una de ellas en uno de los siguientes diluyentes glicerolados :

- 1) Isotónico (320 mOsm/Kg) 11% de leche descremada (p/v), y
- 2) Hipertónico (600 mOsm/Kg) 19% de leche descremada (p/v).

Las soluciones de leche descremada reconstituida fueron calentadas durante 15 min en baño maría a 92-95°C, se dejaron enfriar y se les agregó 500,000 UI de penicilina G procaína, y 625 mg de dihidroestreptomicina /litro de diluyente; el pH se ajustó a 6.7 con una solución concentrada - 500 mM de citrato trisódico. La osmolalidad se determinó con la ayuda del osmómetro (Osmette 5004) antes de añadir el glicerol, cuya concentración final fue del 6%. La adición de los diluyentes glicerolados se realizó en forma fraccionada, y en cantidades iguales cada 15 min en ambas muestras de semen y se equilibraron durante dos horas a partir de la adición de la primera fracción glicerolada (Fiser, Ainsworth y Langford, 1981).

Posteriormente, cada muestra de semen diluido se subdividió en cinco fracciones, cada una de las cuales fue suplementada con una de las siguientes concentraciones de prostaglandinas  $F_{2\alpha}$ , como sal de trometamina (Dinoprost)\* 0, 15, 30, 150 ó 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de semen (Nemon *et al*, 1984), dilución : 1,0  $\mu\text{g}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en 1,0 ml de agua destilada (cuadro 1).

El semen se envasó inmediatamente después de la suplementación con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en pajillas francesas de 0,5 ml. Se congeló en vapor de nitrógeno líquido, a 4,5 cm arriba del nivel del nitrógeno durante siete minutos, y se sumergieron dentro del mismo para su almacenamiento ---- (Aimquist y Wiggin, 1973).

---

\*Lutalyse de laboratorios Tuco (UpJohn Company).

Cada siete días se descongelaron seis pajillas por cada tratamiento en agua caliente a 39°C durante 30 seg y en seis ocasiones; el semen de cada pajilla se resuspendió en dos ml de diluyente isotónico, a 38°C y - pH 6.7 pero sin glicerol, antibióticos ni prostaglandina y se procedió a su evaluación (Fiser, Ainsworth y Fairfull, 1982).

Los porcentajes de motilidad progresiva, así como los de integridad acrosómica se determinaron al descongelado y a los 120 min de la incubación del semen a 38°C. La motilidad progresiva se estimó mediante el microscopio de contraste de fase (400x), se realizó por duplicado y con la ayuda de dos técnicos capacitados para evaluación de este parámetro pero ajenos al estudio; mientras que para estimación de la integridad acrosómica, fue necesario diluir una alícuota del semen de aproximadamente 10-µl, en una gota de solución a base de Tris, ácido cítrico, fructosa (Fogte, 1970) y fluoruro de sodio al 0,3% (Purcell, Johnson y Rampacek, 1972) para facilitar su observación. La cuantificación se realizó por duplicado en cada pajilla y por cada tratamiento mediante microscopía de contraste de fase (1560x); se observaron en total 100 espermatozoides en diez campos distintos, el promedio de las dos cuantificaciones se consideró como una observación, la estimación de este parámetro la realizó un técnico capacitado para su evaluación, pero ajeno al orden e identificación de los tratamientos.

Los datos obtenidos de la motilidad progresiva fueron transformados a arcoseno, no así los referentes a la integridad acrosómica (Steel y Torrie, 1980). Los resultados de ambos parámetros se analizaron independientemente por el método de Cuadrados Mínimos mediante el paquete estadístico S.A.S., (Barr et al., 1979). El modelo matemático utilizado para describir la variación fue el siguiente :

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + \delta_{(i)} + O_j + P_k + T_l + OP_{jk} + OT_{jl} + PT_{kl} + OPT_{jkl} + \epsilon_{(ijk)l}$$

De donde :

$Y_{ijkl}$  es la respuesta de la variable dependiente, motilidad espermática o integridad acrosómica.  $\mu$  es la media poblacional,  $R_i$  es el efecto de la  $i$ -ésima repetición ( $i=1, 2, \dots, 6$ ).  $\delta_{(i)}$  es el error de restricción debido al bloque.  $O_j$  es el efecto fijo de la  $j$ -ésima osmolalidad ( $j=1, 2$ ).  $P_k$  es el efecto fijo de la  $k$ -ésima concentración de prostaglandina  $F_2\alpha$  ( $k=1, 2, \dots, 5$ ).  $T_l$  es el efecto fijo del  $l$ -ésimo tiempo de evaluación ( $l=1, 2$ ).  $OP_{jk}$  es el efecto de la interacción de la  $j$ -ésima osmolalidad con la  $k$ -ésima concentración de prostaglandina  $F_2\alpha$ .  $OT_{jl}$  es el efecto de la interacción de la  $j$ -ésima osmolalidad con el  $l$ -ésimo tiempo de evaluación.  $PT_{kl}$  es el efecto de la interacción de la  $k$ -ésima concentración de prostaglandina  $F_2\alpha$  con el  $l$ -ésimo tiempo de evaluación.  $OPT_{jkl}$  es el efecto de la interacción de la  $j$ -ésima osmolalidad con la  $k$ -ésima concentración de prostaglandina  $F_2\alpha$  y el  $l$ -ésimo tiempo de evaluación.  $\epsilon_{(ijk)l}$  es el error aleatorio distribuido aproximadamente normal e independiente ( $0, \sigma^2$ ). Las interacciones con bloque fueron sumadas al error.

#### 4.2. Fertilidad del semen congelado

El estudio se realizó en el Centro Experimental Pecuario de Mocoohá ubicado en el Municipio de Mocoohá, Yuc., durante los meses de junio a agosto de 1986. Se seleccionaron en base a su buen estado físico 70 borregas adultas de las razas Pelibuey y Blackbelly.

Conforme las borregas presentaron celo fueron distribuidas en dos grupos al azar: en el grupo 1, 31 borregas fueron inseminadas artificialmente con semen criopreservado entre las 15 y 18 horas después de detectado el celo y en el grupo 2, 39 borregas utilizando el mismo tipo de semen, y con inseminación artificial entre las 25 y 28 horas después de detectado el celo (Quadro 2).

El semen utilizado en ambos grupos se obtuvo de seis carneros adultos de la raza Merino Australiana, el cual se congeló un mes antes del inicio del estudio, en un diluyente hipertónico (600mOsm/Kg) a base de le-

che descremada reconstituida y suplementada con 150 µg de prostaglandina F<sub>2α</sub>/ml de semen diluido, ya que este diluyente resultó ser el más adecuado para congelar semen ovino, de entre los diez evaluados en el experimento 1.

La detección de calores se realizó dos veces al día a las 6:00 y -- 18:00 horas con la ayuda de dos machos con el pene desviado. Las borregas se inseminaron artificialmente en una ocasión depositando el semen en la os externa del cérvix (Rukai y Roberts, 1976) y utilizando el aplicador de punta flexible de Cassou. La dosis usada fue de  $300 \times 10^6/0,5$  ml espermatozoides móviles antes de la congelación,

Los parámetros evaluados fueron: porcentaje de no retorno al estro, el cual se estimó mediante el chequeo de calores y el porcentaje de gestación, el cual se estimó mediante laparatomías exploratorias realizadas entre los 30 y 35 días post-inseminación en todas aquellas borregas que durante este período no manifestaron signos de estro (Cutten, 1970). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de la Ji cuadrada (Steel y Torrie, 1980).

CUADRO 1  
DILUYENTES EVALUADOS

OSMOLALIDAD	CONCENTRACION DE PGF <sub>2α</sub>
320 mOsm/Kg (ISOTONICO)	0 MICROGRAMOS/ML SEMEN
	15. " " "
	30 " " "
	150 " " "
	300 " " "
600 mOsm/Kg (HIPERTONICO)	0 MICROGRAMOS/ML SEMEN
	15. " " "
	30 " " "
	150 " " "
	300 " " "
GLICEROL	64 .
pH	6.7

CUADRO 2  
DISEÑO DEL ESTUDIO DE LA FERTILIDAD DEL SEMEN

	GRUPO	
	1	2
No. DE ANIMALES	31	39
TIPO DE SEMEN	CONGELADO	CONGELADO
TIEMPO DE I.A. (después de detectado el estro)	15-18. Hrs.	25-28 Hrs.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1. Congelación del semen

Los efectos debidos a las interacciones de réplica y lector sobre el porcentaje de motilidad espermática (MOT) y el porcentaje de acrosomas intactos (PAI) no resultaron estadísticamente significativos, por lo tanto fueron removidos del modelo. En el cuadro 3 únicamente se presentan los efectos principales y las interacciones que resultaron significativas ( $P < 0,01$ ), tanto para MOT como para PAI.

#### 5.1.1. Tonicidad del diluyente

En el cuadro 4 se muestran las medias mínimo cuadráticas de los efectos principales para las dos variables dependientes, donde se puede observar que la osmolalidad de 600 mOsm/kg (hipertonicidad) fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) a la osmolalidad de 320 mOsm/kg, (isotonicidad) para MOT y PAI.

Estos resultados son consistentes con los publicados por varios autores: Salamon y Lightfoot (1969), Salamon (1969) y Salamon y Brandon (1971) quienes al utilizar diluyentes para congelar semen ovino en pastillas, que incluían a la yema de huevo y al citrato de sodio, observaron el efecto benéfico de la hipertonicidad sobre la motilidad espermática al descongelado. De igual forma, Salamon y Visser (1972) observaron este efecto al utilizar diluyentes a base de yema de huevo y Tris. Inskeep (1974) y Salamon (1976) también mencionaron este hecho, así como Fiser, Ainsworth y Langford (1981) quienes utilizaron diluyentes similares a los utilizados en este estudio y obtuvieron tasas de motilidad al descongelado ligeramente superior.

CUADRO 3

ANALISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD E INTEGRIDAD ACROSCOMICA

ORIGEN DE LA VARIACION	G.L.	CUADRADOS MEDIOS	
		MOTILIDAD	INTEGRIDAD ACROSCOMICA
BLOQUE	5	2.636	2.488
ERROR DE RESTRICION	0		
OSMOLALIDAD	1	23824,341**	4296.03**
PROSTAGLANDINA F <sub>2α</sub>	4	2909,344**	1254.22**
OSMOL. X PGF <sub>2α</sub>	4	1182,617**	384.9.**
TIEMPO DE EVALUACION	1	21765,439**	3808.1.**
OSMOL. X TIEMPO DE EVALUACION	1	723,141**	468.1.**
PGF <sub>2α</sub> X TIEMPO DE EVALUACION	4	251,875**	180.6,**
OSMOL. X PGF <sub>2α</sub> X TIEMPO DE EVALUACION	4	105,495**	235.12**
ERROR	(1440)	18,460	(120) 0.55

\*\* P <0,01 .

( ) GRADOS DE LIBERTAD DEL ERROR

CUADRO 4

MEDIAS MINIMO CUADRATICAS DE LOS EFECTOS PRINCIPALES

	M E D I A S	
	<u>MOTILIDAD</u>	<u>INTEGRIDAD ACROSOMICA</u>
OSMOLALIDAD		
320 mOsm/Kg	26.8 <sup>a</sup>	34.4 <sup>a</sup>
600 mOsm/Kg	34.9 <sup>b</sup>	47.2 <sup>b</sup>
PROSTAGLANDINA F <sub>2α</sub>		
0 MICROGRAMOS/ML	33.6 <sup>a</sup>	31.5 <sup>a</sup>
15 MICROGRAMOS/ML	32.2 <sup>a</sup>	44.6 <sup>b</sup>
30 MICROGRAMOS/ML	32.1 <sup>a</sup>	48.8 <sup>b</sup>
150 MICROGRAMOS/ML	31.2 <sup>a</sup>	44.0 <sup>b</sup>
300 MICROGRAMOS/ML	25.4 <sup>b</sup>	35.1 <sup>a</sup>
TIEMPO DE EVALUACION		
0 MIN.	34.8 <sup>a</sup>	46.4 <sup>a</sup>
120 MIN.	27.0 <sup>b</sup>	35.2 <sup>b</sup>

a,b/ LITERALES DISTINTAS SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES (P<0.05)

res, diferencias debidas; 1) a que no utilizaron prostaglandina en la -- preparación de los diluyentes; 2) a que la osmolalidad real de sus dos -- mejores diluyentes fue menor (510 y 560) y 3) a que la escala de evaluación que utilizaron fue diferente a la utilizada en este estudio. Además no hay que pasar por alto que la estimación de este parámetro es meramente subjetiva, hecho que hay que considerar al contrastar resultados. Fiser, Ainsworth y Fairfull (1982) quienes utilizaron diluyentes distintos a los de este estudio, pero con osmolalidades reales iguales a las -- utilizadas en el presente estudio, obtuvieron resultados semejantes a los aquí presentados.

Con respecto a la integridad acrosómica, aparentemente no existen estudios específicos del efecto de la osmolalidad sobre ésta, por lo cual -- no es posible comparar los resultados que aquí se presentan. Sin embargo debido a que la fertilidad del semen criopreservado ha sido positivamente correlacionada con la integridad acrosómica (Smorang y Kareta, 1974) es -- importante señalar el efecto benéfico que se observó sobre este parámetro al utilizar soluciones hipertónicas.

El efecto benéfico de las soluciones hipertónicas sobre la criovivibilidad espermática e integridad acrosómica al descongelado parece deberse a: 1) una resistencia inducida hacia el "efecto de solución", ésto es, -- una protección que desarrolla la célula hacia la hipertonidad (o aumento en la concentración de solutos) que normalmente se presenta, conforme el agua es renovada del medio intra y extracelular durante la congelación y 2) una deshidratación parcial de los espermatozoides antes de ser sometidos a la congelación a través de un mecanismo de exósmosis, lo cual con -- duce a una menor formación de cristales de hielo en el medio intracelular (Meryman, Williams y Douglas, 1977; Fiser, Ainsworth y Langford, 1981; Fiser, Ainsworth y Fairfull, 1982).

### 5.3.2. Concentración de prostaglandina

En el cuadro 4 se puede observar que a una concentración de 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MOT fue de 20.0%, diferente a las otras cuatro concentraciones, mientras que para el PAI, se observó que las tres concentraciones intermedias de 15, 30 y 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , no fueron diferentes entre sí ( $P > 0.05$ ), pero fueron superiores ( $P < 0.05$ ), a las de 0 y 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Pocos estudios se han realizado para determinar el efecto de la suplementación con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre los parámetros aquí evaluados, de esta manera, Gustafsson et al. (1977) observaron un 49% de motilidad al descongelado, en espermatozoides epididimales criopreservados en un diluyente a base de yema de huevo y Tes-Nalk, suplementado con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a razón de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , mientras que en este estudio, con el tratamiento que más se aproximó al de ellos (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se obtuvo un 28.4% de motilidad; en cuanto al PAI, estos autores no observaron efecto alguno de la suplementación con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , a diferencia del presente estudio donde se observó un incremento de este parámetro, en todos los diluyentes que incluyeron  $\text{PGF}_{2\alpha}$  independientemente de su concentración. De igual forma, estos resultados difieren de los publicados por Marley et al. (1976); Memon et al. (1980) y Meimon et al. (1984) quienes observaron que la suplementación con prostaglandinas en concentraciones de hasta 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  no tuvo efectos detrimentales sobre la motilidad espermática, metabolismo celular e integridad acrosómica al descongelado, mientras que en este estudio al utilizar concentraciones de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  menores, se observó un efecto detrimental sobre el MOT y un efecto benéfico sobre el PAI.

Contrastar los resultados aquí obtenidos con los publicados por estos autores resulta difícil, debido a las distintas condiciones experimentales de los estudios, así por ejemplo, mientras que ellos utilizaron

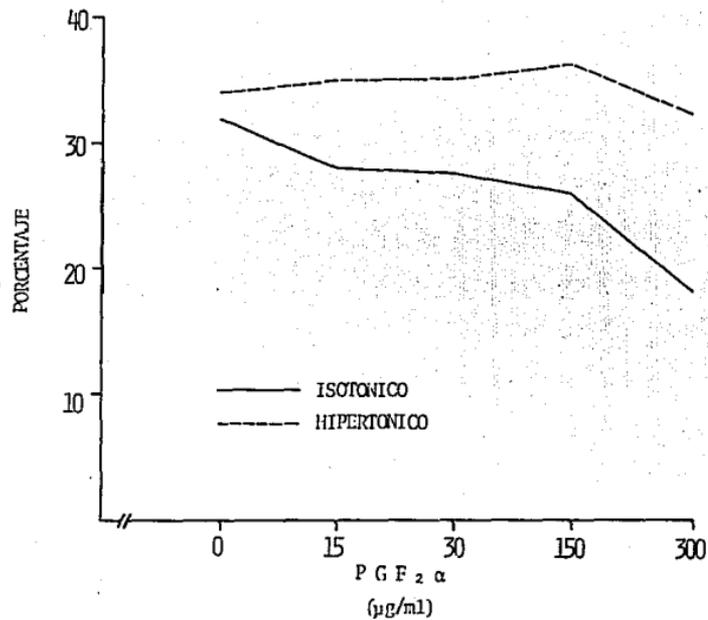
diluyentes a base de yema de huevo y aproximadamente isotónicos, en este estudio se utilizó leche descremada y yema de huevo para la preparación de los diluyentes en concentraciones isotónicas e hipertónicas, por lo cual, hay que tomar con cautela las comparaciones aquí presentadas.

El carnero es una de las especies que presentan mayor concentración de prostaglandinas en el eyaculado (Marley, Morris y White, 1977), sin embargo, el papel fisiológico que éstas desempeñan sobre la fertilidad, no ha sido dilucidado. Las hipótesis propuestas se apoyan en el efecto estimulador que las prostaglandinas ejercen sobre la contractilidad, - al menos in vitro, del cérvix de la oveja, y/o a que éstas modifican las características del moco cervical, para facilitar la penetración de los espermatozoides a través de éste; incrementando en ambos casos la fertilidad del semen (Edqvist et al., 1985; Einarsson y Gustafsson, 1975; Me--mon et al., 1984).

En la gráfica 1 se presenta el efecto conjunto de la osmolalidad y la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$  sobre MOT, y se observa en el diluyente isotónico una disminución en este parámetro conforme se incrementó la concentración de  $\text{PGF}_2\alpha$ , no así en el hipertónico donde se aprecia un leve efecto benéfico sobre MOT hasta los 150  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_2\alpha$ , para posteriormente disminuir con la concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$ . Es importante observar que la motilidad más baja en el hipertónico, fue similar a la más alta en el isotónico.

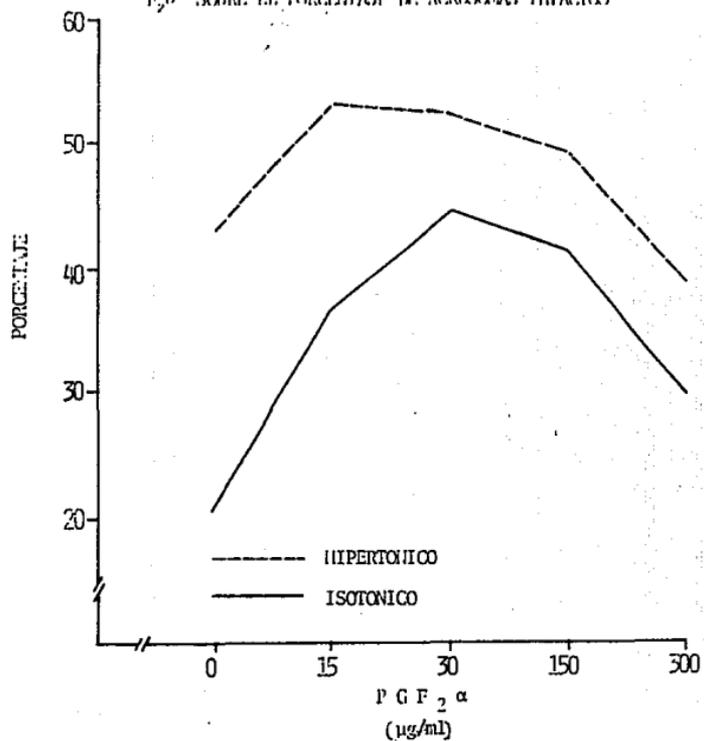
En la gráfica 2 se presenta el efecto de la misma interacción sobre PAI, donde se observa en el diluyente isotónico un marcado efecto benéfico sobre este parámetro hasta los 30  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_2\alpha$  para después disminuir drásticamente con las concentraciones más elevadas, mientras que en el diluyente hipertónico el PAI se benefició con 15, 30 y 150  $\mu\text{g/ml}$  de -

GRAFICA 1  
EFECTO DE LA OSMOLALIDAD Y DE LA CONCENTRACION DE PROSTAGLANDINA  
 $F_2\alpha$  SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMATICA



GRAFICA 2

EFEECTO DE LA OSMOLALIDAD Y DE LA CONCENTRACION DE PROSTAGLANDINA  
E<sub>2</sub> SOBRE EL PORCENTAJE DE ACRECIMOS LITACTOS



de  $PGF_{2\alpha}$ . Cabe señalar que el PAI del hipertónico que no incluyó  $PGF_{2\alpha}$  (O), fue similar a el mejor observado en el isotónico.

### 5.1.3. Tiempo de evaluación

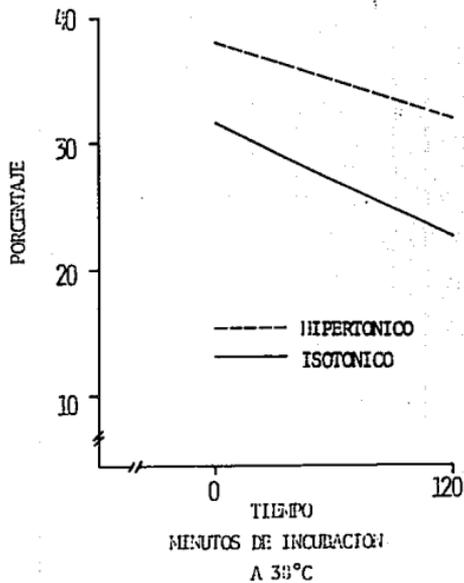
En cuanto al tiempo de evaluación, en el cuadro 4 se observa una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en ambos parámetros cuando el semen se evaluó después de 120 min de incubación a  $38^{\circ}\text{C}$ , lo cual coincide, independientemente del tipo de diluyente y condiciones experimentales, con todas las publicaciones revisadas en las que se consideró este factor.

El hecho de volver a evaluar al semen después de determinado tiempo de descongelado es considerado como una prueba de calidad, tanto para el diluyente como para los espermatozoides, ya que nos indica el tiempo que estos son capaces de mantener la motilidad y la integridad acrosómica, factores importantes para la fertilidad, en un medio ambiente artificial como lo es el diluyente (Foote, 1982)

La disminución de MOT y del PAI que normalmente se presenta, está asociada con un agotamiento de las reservas energéticas del espermatozoide, así como a una menor resistencia de éstos, debido a las condiciones estresantes a que fueron sometidos durante su manejo (Salisbury, VanDenmark y Lodge, 1978).

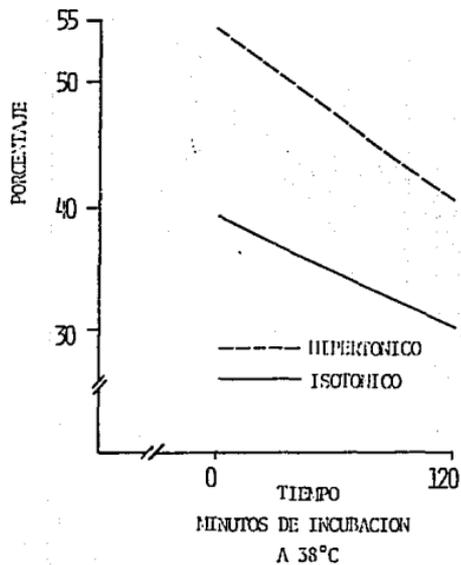
En la gráfica 3 y 4 se presenta el efecto conjunto de la osmolalidad del diluyente y del tiempo de evaluación sobre MOT y PAI, en donde se observa una severa disminución en ambos parámetros a los 120 min de incubación independientemente de la osmolalidad, no obstante, cabe señalar que los porcentajes de MOT y PAI a los 120 min de incubación a  $38^{\circ}\text{C}$  en los diluyentes hipertónicos fueron similares a los observados al descongelado en los diluyentes isotónicos.

GRAFICA 3  
EFECTO DE LA OSMOLALIDAD Y DEL TIEMPO DE EVALUACION  
SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMATICA



GRAFICA 4

EFFECTO DE LA OSMOLALIDAD Y DEL TIEMPO DE EVALUACION  
SOBRE EL PORCENTAJE DE ACROSOMAS INTACTOS



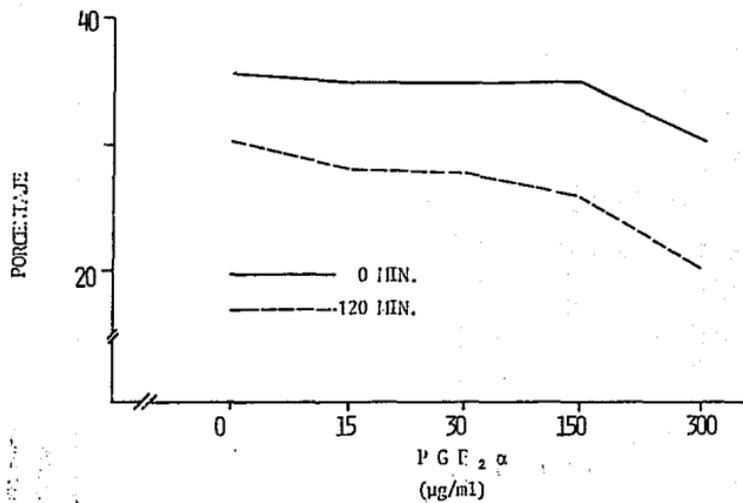
En la gráfica 5 se presenta el efecto de la concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y del tiempo de evaluación sobre MOT, y se observa que al descongelado - la motilidad disminuyó ligeramente hasta la concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$  para caer posteriormente con la de 300  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , no así a los 120 min de incubación donde ésta disminuyó conforme se incrementó la concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . En la gráfica 6 se presenta un efecto similar sobre PAI, y se puede observar al descongelado, un incremento en este parámetro hasta la concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ , para disminuir ligeramente con la de 150  $\mu\text{g/ml}$  y caer con la de 300  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . A los 120 min de incubación, la disminución que se observó de este parámetro siguió un comportamiento similar.

En el cuadro 5 se presentan las medias de los tres factores principales para MOT y se puede apreciar que en los diluyentes hipertónicos al descongelado, este parámetro se mantuvo aproximadamente igual en las distintas concentraciones de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , mientras que a los 120 min de incubación, la disminución de MOT que se presentó siguió la misma tendencia, aunque la caída que se observa en la concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  fue más severa que la observada al descongelado. En cuanto a los diluyentes isotónicos al descongelado, se observa su inferioridad con respecto a los hipertónicos, así como el efecto detrimental de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre MOT, de igual forma, la disminución de este parámetro a los 120 min de incubación, siguió una tendencia aproximadamente paralela con respecto al descongelado. Asimismo se puede apreciar que MOT en los diluyentes hipertónicos a los 120 min de incubación fue similar al observado en los diluyentes isotónicos al descongelado.

En el cuadro 6 se presentan las medias de los tres factores principales para PAI, donde se observa una vez más la superioridad de los dilu

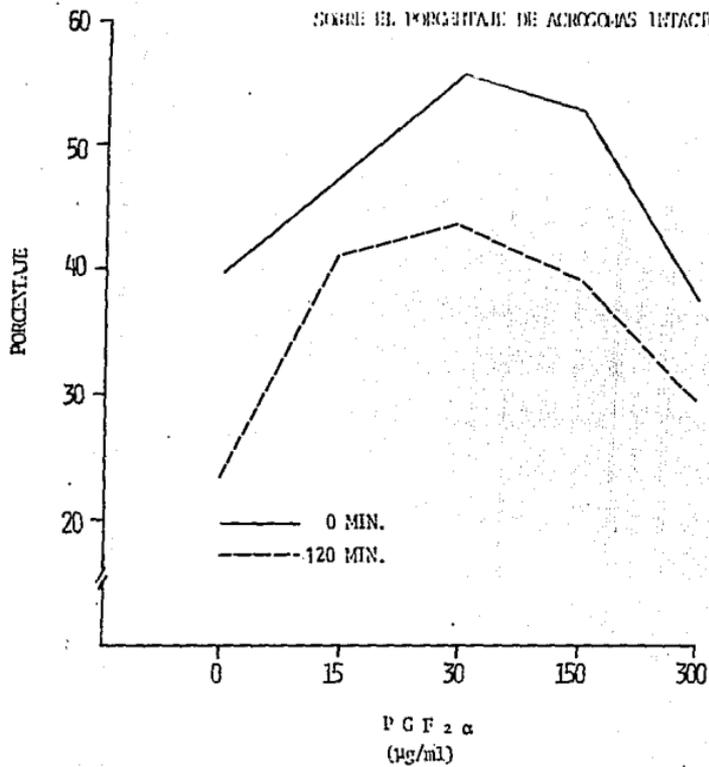
GRAFICA 5

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE PROSTAGLANDINA  $F_{2\alpha}$  Y DEL TIEMPO DE  
EVALUACION SOBRE LA POTILIDAD ESPERMATICA



GRAFICA 6

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE PROSTAGLANDINA  $F_2\alpha$  Y DEL TIEMPO DE EVALUACION  
 SOBRE EL PORCENTAJE DE ACRÓGOMAS INTACTOS



CUADRO 5

MEDIAS DEL EFECTO CONJUNTO DE LOS TRES FACTORES PRINCIPALES SOBRE EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD PROGRESIVA

OSMOLALIDAD

320 mOsm/Kg      600 mOsm/Kg

TIEMPO DE EVALUACION  
(MIN)

CONCENTRACION DE  
PGF<sub>2α</sub>  
(µg/ml)

	<u>0</u> <u>120</u>		<u>0</u> <u>120</u>		X
0	35,5	29,3	37,7	32,0	33,6
15	33,4	24,4	38,2	32,8	32,2
30	33,4	25,8	38,2	33,1	32,1
150	32,1	20,1	39,5	33,4	31,2
500	23,4	13,4	37,2	27,9	25,4
X	31,5	22,2	38,1	31,8	

CUADRO 6

MEDIAS DEL EFECTO CONJUNTO DE LOS TRES FACTORES PRINCIPALES SOBRE EL PORCENTAJE DE ACROSONAS INTACTOS

		<u>OSMOLALIDAD</u>				
		<u>320 mOsm/Kg</u>		<u>600 mOsm/Kg</u>		
TIEMPO DE EVALUACION (MIN)	CONCENTRACION DE PGF <sub>2α</sub> (µg/ml)	0	120	0	120	$\bar{X}$
		0	30.3	10.5	49.5	
15	38.0	54.0	57.0	49.7	44.6	
30	49.0	40.7	60.4	45.1	48.8	
150	45.6	39.7	60.9	52.0	44.0	
300	51.8	26.7	44.0	37.9	55.1	
$\bar{X}$		38.5	30.3	54.3	40.1	

yentes hipertónicos, así como un incremento de este parámetro al descongelado hasta la concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ , para caer con la 300  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , mientras que a los 120 min de incubación el PAI más elevado se observó en la concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  para disminuir posteriormente en las concentraciones mayores. Se puede observar también, que -- aunque la concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  fue mejor al descongelado, también fue la menos eficiente para mantener el PAI a los 120 min de incubación. En cuanto a los diluyentes isotónicos al descongelado, se observa el efecto benéfico de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre este parámetro hasta la concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ , para posteriormente caer en las concentraciones mayores, mientras que a los 120 min de incubación, además de la disminución del PAI, que el tratamiento que no incluyó  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (concentración 0 -  $\mu\text{g/ml}$ ) fue el menos eficiente para preservar la integridad acrosómica durante la incubación.

En el cuadro 7 se muestra que al considerar conjuntamente el efecto de los tres factores sobre ambos parámetros evaluados, los diluyentes -- que al descongelado resultaron ser los más adecuados para congelar semen ovino fueron los hipertónicos con 30 y 150  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ya que presentaron los porcentajes más elevados tanto para MOT como para el PAI, siendo iguales ( $P > 0.05$ ) entre sí. En el cuadro 8 se observa que a los 120 min de incubación a 38°C, los diluyentes que mejor mantuvieron la motilidad fueron los hipertónicos con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  hasta de 150  $\mu\text{g/ml}$  los cuales fueron iguales ( $P > 0.05$ ) entre sí; en cuanto al PAI los mejores fueron los hipertónicos con 15  $\mu\text{g/ml}$  seguidos por los de 30  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

CUADRO 7

PORCENTAJE DE MOTILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMICA QUE PRESENTO EL SEMEN OVINO AL DESCONGELADO  
EN CADA DILUYENTE

	O S M O L A L I D A D									
	600 mOsm/Kg (HIPERTONICOS)					320 mOsm/Kg (ISOTONICOS)				
	CONCENTRACION DE PGF <sub>2α</sub>					CONCENTRACION DE PGF <sub>2α</sub>				
	0	.15	30	150	300	0	.15	30	150	300
MOTILIDAD %	37.7 <sup>b</sup>	38.2 <sup>ab</sup>	38.2 <sup>ab</sup>	39.5 <sup>a</sup>	37.2 <sup>b</sup>	35.5 <sup>c</sup>	33.4 <sup>d</sup>	33.4 <sup>d</sup>	32.1 <sup>d</sup>	23.4 <sup>e</sup>
INTEGRIDAD ACROSOMICA %	49.5 <sup>c</sup>	57.0 <sup>b</sup>	60.4 <sup>a</sup>	60.9 <sup>a</sup>	44.0 <sup>d</sup>	30.3 <sup>h</sup>	38.0 <sup>f</sup>	49.0 <sup>c</sup>	43.6 <sup>e</sup>	31.8 <sup>g</sup>

a,b,c,d,e,f,g,h./ LITERALES DISTINTAS SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES (P<0.05)

CUADRO 8

PORCENTAJES DE MOTILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMICA QUE PRESENTO EL SEMEN OVINO DESPUES DE 120 MIN DE INCUBACION A 38°C EN CADA DILUYENTE

	O S M O L A L I D A D									
	600 mOsm/Kg (HIPERTONICOS)					320 mOsm/Kg (ISOTONICOS)				
	CONCENTRACION DE PGF <sub>2</sub> α					CONCENTRACION DE PGF <sub>2</sub> α				
	0	15	30	150	300	0	15	30	150	300
MOTILIDAD. %	32.0 <sup>a</sup>	32.8 <sup>a</sup>	33.1 <sup>a</sup>	33.4 <sup>a</sup>	27.9 <sup>b</sup>	29.3 <sup>b</sup>	24.4 <sup>c</sup>	23.8 <sup>c</sup>	20.1 <sup>d</sup>	13.4 <sup>e</sup>
INTEGRIDAD ACROSOMICA. %	36.0 <sup>f</sup>	49.7 <sup>a</sup>	45.1 <sup>b</sup>	32.0 <sup>h</sup>	37.9 <sup>e</sup>	10.5 <sup>j</sup>	34.0 <sup>g</sup>	40.7 <sup>c</sup>	39.7 <sup>d</sup>	26.7 <sup>i</sup>

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j/ LITERALES DISTINTAS SON ESTADISTICAMENTE DIFERENTES (P<0,05)

## 5.2. Fertilidad del semen

En el cuadro 9 se presentan los porcentajes de no retorno al estro ( $\%NR$ ) y de gestación ( $\%GEST$ ) para cada grupo, donde se observa que no hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) entre éstos en ninguno de los parámetros evaluados.

Los porcentajes de gestación en ambos grupos fueron bajos, sin embargo, la mayoría de los estudios sobre este aspecto, que han publicado tasas de fertilidad superiores a las aquí presentadas, han usado dosis espermiáticas mayores y generalmente doble inseminación durante el mismo estro. De esta forma, Gustafsson, Edqvist y Einarsson (1975) publicaron 70% de pariciones al inseminar a diez ovejas con semen criopreservado en yema de huevo-Tesnak y suplementado con 300  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , la concentración espermiática fue de  $250 \times 10^6$  y doble inseminación. Con el diluyente utilizado en el presente estudio se usó la mitad de la concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ya que ésta resultó ser la más adecuada en el primer estudio, además, la dosis espermiática fue inferior a la de ellos, sobre todo si se considera que la aplicaron en dos ocasiones, mientras que en este estudio se inseminó en una ocasión, ya que uno de los objetivos fue el de evaluar la fertilidad del semen criopreservado en este tipo de diluyente cuando se aplica en concentraciones reducidas. Fiser, Ainsworth y Langford (1981) obtuvieron 67.5% de gestaciones utilizando semen criopreservado en un diluyente hipertónico similar al utilizado en este estudio pero sin prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ , sin embargo utilizaron concentraciones espermiáticas de  $640 \times 10^6$  y doble inseminación.

Por otro lado, en el mismo cuadro 9 se puede observar la poca similitud entre los  $\%NR$  y los  $\%GEST$  en cada grupo. Esta disimilitud entre ambos parámetros podría deberse a pérdidas embrionarias tempranas, que

normalmente se presentan tanto en monta natural como en inseminación artificial; así Mattner y Braden (1967) al estudiar ovejas Merino servidas mediante monta natural, observaron que de un 96% que presentaron óvulos fertilizados al ser sacrificadas durante los dos primeros días post-servicio, a los 20 días únicamente el 76% se encontraba gestantes. Salamon y Lightfoot (1967) obtuvieron hasta un 93% de fertilización al inseminar intrauterinamente a ovejas con semen criopreservado, sin embargo, sólo el 34% no regresaron al estro a los 22 días, y únicamente el 25% de éstas parieron. En un estudio posterior, Lightfoot y Salamon (1970b) al depositar el semen criopreservado a nivel del cérvix, obtuvieron 58% de fertilización y 50% de pariciones.

Cabe hacer mención que la determinación de los porcentajes de no retorno al estro hasta los 35 días post-inseminación es un parámetro de poca confiabilidad para evaluar la fertilidad, al menos en la especie ovina. Peña et al. (1984) hicieron la misma observación sobre este hecho al estudiar a la raza Romney Marsh. Varios estudios se han realizado con el objeto de entender esta falla en la presentación del estro post-servicio, lo cual parece estar asociado con la mortalidad embrionaria temprana; Sawyer y Knight (1975) observaron que cuando la muerte embrionaria se presentaba entre los días 15 y 19 de gestación, la oveja manifestaba estro en un período de tiempo de igual magnitud al que tenía de gestación, y que éste estro era poco fértil debido a que la presencia del material en reabsorción crea dentro del medio uterino, un ambiente poco favorable para el espermatozoide y/o el óvulo. Edey (1979) observó que cuando la muerte embrionaria se presentaba antes del día 12 de gestación, no se alteraba la longitud del ciclo estral, sin embargo si sucedía después de ésta fecha, la regresión del cuerpo luteo no se llevaba a cabo hasta la total

total reabsorción del conceptus; asimismo, este autor también menciona que en este último caso, el estro que se presenta es de baja fertilidad, lo cual es debido a fallas en el transporte espermático dentro del tracto genital de la hembra; Jainudeen (1980) al estudiar a la especie bovina obtuvo resultados similares.

En el presente estudio la poca similitud entre el %NR y el %GEST en el grupo 1 es consistente con los porcentajes de mortalidad embrionaria temprana que normalmente se observan en la especie ovina y que van del 20 al 30% (Edey, 1979), no así en cuanto al grupo 2, donde se observa -- una marcada disimilitud entre ambos parámetros.

En el cuadro 10 se presentan los porcentajes de no retorno al estro y de gestación por raza, donde se puede observar que los %NR fueron similares en las dos razas, lo que nos indica que presentaron la misma capacidad fertilizante.

CUADRO 9

PORCENTAJE DE OVEJAS QUE NO RETORNARON AL ESTRO Y PORCENTAJES DE GESTACION EN CADA GRUPO

	G R U P O	
	I.A. 15-18 Hrs	I.A. 25-28 Hrs
TOTAL I.A.	31	39
N.R. AL ESTRO %	55,4 (11) <sup>a</sup>	53,8 (21)
GESTACION %	29,0 (9)	30,7 (12)

<sup>a</sup>/ ENTRE PARENTESIS EL NUMERO DE ANIMALES

N.S. (P>0.05)

CUADRO 10

PORCENTAJE DE OVEJAS QUE NO RETORNARON AL ESTRO Y PORCENTAJES DE GESTACION EN CADA RAZA

	R A Z A S	
	PELIPUEY	BLACKBELLY
TOTAL I.A.	45	25
N.R. AL ESTRO %	44,4 (20) <sup>a</sup>	48,0 (12)
GESTACION %	28,8 (15)	32,0 (8)

<sup>a</sup>/ ENTRE PARENTESIS EL NUMERO DE ANIMALES.

N.S. (P>0.05)

## VI. CONCLUSIONES

Se determinó que los diluyentes hipertónicos a base de leche de vaca descremada y reconstituida, fueron superiores a los isotónicos en cuanto al porcentaje de motilidad y al porcentaje de la integridad acrosómica, - tanto al descongelado como a los 120 min de incubación a 38°C.

Que en los diluyentes hipertónicos a base de leche de vaca descremada y reconstituida, la suplementación con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  en concentraciones de 30 hasta 150  $\mu\text{g/ml}$ , incrementó los porcentajes de motilidad espermática e integridad acrosómica al descongelado, mientras que en los diluyentes isotónicos, la suplementación con prostaglandina  $F_{2\alpha}$  tuvo efecto detrimental sobre la motilidad espermática al descongelado, pero benefició al porcentaje de integridad acrosómica al descongelado independientemente de la concentración.

Que las concentraciones de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  que presentaron los porcentajes de integridad acrosómica más elevados al descongelado, tanto en los diluyentes isotónicos como en los hipertónicos, fueron las menos eficientes para preservarlos a los 120 min de incubación a 38°C.

En cuanto a la fertilidad del semen, se determinó que en base a estos parámetros los dos tratamientos así como las dos razas estudiadas fueron estadísticamente iguales.

Que la inseminación artificial entre las 15 y 18 hrs o entre las 25 y 28 hrs de detectado el estro, con semen criopreservado en un diluyente hipertónico a base de leche de vaca descremada, suplementado con 150  $\mu\text{g/ml}$  de prostaglandina  $F_{2\alpha}$  y en concentraciones de  $150 \times 10^6$  espermatozoides, - presentó porcentajes bajos de no retorno al estro y de gestación.

Se observó que la determinación del porcentaje de no retorno al estro a los 35 días post-servicio, es un parámetro de poca confiabilidad para evaluar la fertilidad en estas razas ovinas.

## VII. LITERATURA CITADA

- Aamdal, J. and Andersen, K. 1968. Freezing of ram semen in straws. Proc. VIth. Int. Congr. Anim. Reprod. Paris. 2:977-980
- Acuña, A.M.A. y Valencia, Z.M. 1982. Evaluación de los diluyentes para -- congelar semen de borrego Pelibuey. Tesis de Licenciatura. FES--- Cuautitlán. UNAM, México.
- Alberio, R. and Colas, G. 1976. Influence of photoperiodism on the sexual development of the young Ile-De-France ram. Proc. VIth. Intern. -- Congr. Anim. Reprod. AI. Cra-Cow. 3:26-29
- Almquist, J.O. and Wiggin, H.B. 1973. Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. A.I. Digest. 21: 1-4
- Amir, D. and Schindler, H. 1972. The conception rate of ewes after artificial insemination at different times during oestrus. J. Reprod. --- Fert. 28:261-264
- Amir, D., Schindler, H., Byal, E., Lehrer, R.A. and Kempenich-Pinto, O. --- 1973. The effect of the ratio of dilution of ram semen in different diluents on the conception rate. Am. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 13:1-5
- Andersen, K., Aamdal, J. and Fougner, J.A. 1973. Intrauterine and deep -- cervical insemination with frozen semen in sheep. Zuchthyg. 8:113--118
- Arbiza, A. S.I. 1984. Estado actual de la ovino-cultura en México. Perspectivas en : Memorias del Curso Bases de la Cría Ovina. Toluca Méx.
- Barr, J.A., Goodnight, J.H., Sall, J.P., Blair, W.H. and Chilco, D.M. 1979 SAS Institute, Inc. Raleigh. North Carolina.
- Barna, N., Sahani, M.S. and Pant, K.P. 1981. Preservability of spermatozoa of Soviet Merino and Rambouillet rams of different ages. Indian Vet. J. 58:959-962
- Bittman, E.L., Karsch, F.J. and Hopkins, V.W. 1985. Role of the Pineal --- Gland in Ovine Photoperiodism: Regulation of seasonal breeding and negative feed back effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. Endocrinology. 113:329-336

- Braden, A.W.H., Turnbull, K.E., Mattner, p.e. and Moule, G.R. 1974. Effect of protein and energy content of the diet on the rate of sperm production in rams. Aust. J. Biol. Sci. 27:67-73
- Bureau, A. and Negoita, V. 1971. Freezing ram semen in ampules to  $-196^{\circ}\text{C}$  Anim. Breed. Abstr. 40:605
- Colas, G., Brice, G., Courot, M. and Cottier, M. 1971. Artificial insemination in the plan of intensification of ovine production: Present state and perspectives. Bull. Tech. Inform. 257:1
- Colas, G. 1972. Ewe fertility following insemination with liquid or deep frozen semen in the course of oestruses induced by progestins during the breeding season. Proc. VIIIth. Int. Congr. Anim. Reprod. 2:925
- Colas, G. 1975a. The use of progestagen SC9880 as an aid for artificial insemination in ewe. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 15:317-327
- Colas, G. 1975b. 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
- Colas, G. and Brice, G. 1976. Seasonal variations of the fertilizing capacity of the deep-frozen ram semen. VIIIth. Intern. Congr. Anim. Reprod. A.I. Cra-Cow. 977-979
- Colas, G. and Courot, N. 1977. Production of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in the sheep. Proc. Symp. Mang. Reprod. in Sheep and Goats. Madison, Wisc. 31-40
- Colas, G. and Guerin, Y. 1981. A new method for thawing frozen ram semen. Theriogenology. 16:623-630
- Courot, M., Hochereau, M.T. and Ortavant, R. 1970. Spermatogenesis In: The Testis. A.D. Johnson, Gones, W.R. and VanDermark, N.L. (eds) - Academic Press. London. Vol. 1. 339-432
- Courot, M. 1979. Semen quality and quantity in the ram. In: Sheep Breeding. Tomes, G.L., Robertson, D.E. and Lightfoot, T.J. (eds). 2nd ed. Butterworths, London. 495-504
- Chandra, D.B. and Ramamohana, R.A. 1980. Preservation of ram semen. Indian. Vet. J. 57:130-134
- Chang, R. 1986. Fisiología con aplicaciones a sistemas biológicos. Ed. CECSA. Méx. 205-244
- Duyder, A.H. and Taha, A. 1984. Survival rate of spermatozoa supplemented with prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$ . 10th. Inter. Congr. Anim. Reprod. A.I. Illinois. 302

- Davies, R.V., Main, S.J. and Setchell, B.P. 1977. Seasonal changes in -- plasma follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rams. J. Endocr. 72:12-13.
- De la Madrid, H.M. 1986. Cuarto Informe de Gobierno. Estadístico Producción Pecuaria.
- Desjardins, C. 1981. Endocrine signaling and male reproduction. Biol. Re prod. 24:1-21.
- Dimov, V. and Georgiev, G. 1977. Ram semen prostaglandin concentration and its effect on fertility. J. Anim. Sci. 44:1050-1054.
- Dymundsson, O.R. 1972. Studies on the attainment of puberty and reproductive performance in Clun Forest ewe and ram lamb. In: Sheep and goat manual, R.S. Ott and M.A. Memon, Ed. Society for Theriogenology. 1-3
- Eddy, T.N., 1979. Embryos mortality. In: Sheep Breeding. Tomes G.L., -- Robertson DE and Lightfoot, R.J. (eds) 2nd, ed. Butterworths. London, 37:315
- Edqvist, S., Einarsson, S. and Gustafsson, B. 1975. Effect of prostaglandin  $F_2\alpha$  on sperm transport in the reproductive tract of the ewe. Acta. Vet. Scand. 16:149-151
- Edqvist, S., Einarsson, S., Gustafsson, B., Linde, C. and Lindell, J.O. 1975. The in vitro and in vivo effects of prostaglandins  $E_1$  and  $F_2\alpha$  and of oxitocin on the tubular genital tract of ewes. Int. J. Fertil. 20:234-238
- Entwistle, K.W. and Martin, I.C.A. 1972. Effect 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. 25:379-386
- First, N.L., Sevinge, A. and Henneman, H.A. 1961. Fertility of frozen -- and unfrozen ram semen. J. Anim. Sci. 20:79-84
- First, N.L., Henneman, H.A., Magee, W.T. and Williams, J.A. 1961. The -- frozen storage of ram semen. J. Anim. Sci. 20:74-78
- Fiser, P.S. 1979. New extenders for freezing ram semen. Cryobiology. 16: 614-615 (abstract).
- Fiser, P.S., Ainsworth, L. and Fairfull, R.W., 1982. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. Can. J. Anim. Sci. 62:425-428
- Fiser, P.S., Ainsworth, L. and Langford, G.A. 1981. Effect of osmolality of Skim-Milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. Cryobiol. 18:399-403

- Fiser, P.S. and Langford, G.A. 1981. The effect of sodium phenobarbital and storage time on preservation of ram spermatozoa motility at -- 5°C. Can. J. Anim. Sci. 61:847-851
- Fiser, P.S. and Fairfull, R.W. 1983. Effect of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. Cryobiology. 20: 684-689
- Fiser, P.S. and Fairfull, R.W. 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling, velocity, and osmolality of Skim-Milk. Theriogenology. 25:473-484
- Fitzhugh, H.A. and Bradford, G.W. 1986. Hair sheep of Western Africa and the Americas. A Genetic Resource for the Tropics. Westview Press Inc. U.S.A.
- Foote, R.H. 1970. Fertility of bull semen at high extensive rates in --- Tris-buffered extenders. J. Dairy Sci. 53:1475-1477
- Foote, R.H. 1975. Semen quality from the bull to the freezer and assessment. Theriogenology. 3:219-235
- Foote, R.H. 1978. Extenders and extension of unfrozen semen In: Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Salisbury, G.W., VanDermark, N.L. and Lodge, J.R. (eds). Freeman-Co. San Francisco. 442-493
- Foote, R.H. 1981. The artificial insemination industry. In: New technologies in animal breeding. Brackett, G.B. and Seidel, M.S. (eds) Academic Press. 14-39
- Foote, R.H. 1982. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: Past, present, and future. J. Androl. 3:85-100
- Foote, R.H. 1984. General evaluation of male reproductive capacity. 10th Inter. Congr. Anim. Reprod. A.I. Illinois Vol. 4:X-1
- Foster, D.L., Mickelson, I.H., Ryan, K.D., Coon, G.A., Drongowski, R.A. - and Holt, J.A. 1978. Ontogeny of pulsatile luteinizing hormone -- and testosterone secretion in male lambs. Endocrinology. 102:1137--1146
- Fraser, A.F. 1968. Progress in the artificial insemination of sheep with frozen semen. Proc. Vith. int. Congr. Anim. Reprod. Paris.2:1033--1036
- Rukui, Y. and Roberts, E.M. 1976. Fertility of non-surgical intrauterine insemination with frozen-pelleted semen in ewe treated with prosta glandin F<sub>2α</sub>. Proc.Int. Congr. Sheep Breed. Muresk.482-494
- Ganong, W.F. 1982. Fisiología Médica. 8a. Ed. El manual moderno. México, D.F. 1-28

- Garner, L.D. and Hafez, E.S.E. 1980. Spermatozoa. In: Reproduction in --- farm animals, Hafez E.S.E. (ed) 4th. ed: Lea & Febiger, Philadelphia. 167-188
- George, J.M. 1969. Scrotal wool cover and ram fertility. Aust. Vet. J. - 45:589
- Graham, E.F., Crabo, B.G. and Pace, M.M. 1978. Current status of semen -- preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci. 47 (Suppl 2): 80-118
- Gustafsson, B.K., Edqvist, S. and Einarsson, S. 1975. The fertility of -- deep-frozen ram semen supplemented with PGF<sub>2</sub>α. Acta Vet. Scand. 16: 468-470
- Gustafsson, B., Crabo, B.G., Graham, E.F. and Memon, M.A. 1977. Effect of prostaglandins E<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>α on post-thaw survival and morphology of ram spermatozoa. Proc. 14th. Ann. Meet. Soc. Cryobiol. July 31- -- August 4, Minneapolis, Minn.
- Gustafsson, B., Graham, E.F., Crabo, B.G., Pavelko, M.K. and Wagner, W.C. 1976. Prefreeze supplementation of ram semen with PGE and PGF<sub>2</sub>α. - Effect of sperm vitality *in vitro* and on sperm transport in the -- ewe. Proc. 10th. Ann. Meet. Soc. Stu. Reprod. Texas.
- Gustafsson, B.K. 1978. Aspects of fertility with frozen thawed ram semen Cryobiology. 15:358-361
- Hackett, A.J. and Wolynetz, M.S. 1982. Reproductive performance of totally confined sheep bred with semen extended in a Lactose-egg-yolk-- glycerol buffer and stored at 5°C. Can. J. Comp. Med. 46:327-333.
- Hawk, H.W. and Conley, H.H. 1975. Involvement of the cervix in sperm transport failures in the reproductive tract of the ewe. Biol. Reprod. 13:322-328
- Hernández, J.J.P., Rodríguez, R.O. y González, P.E. 1976. Evaluación de - cuatro métodos para colección de semen de borrego Tabasco o Peli-buey. Téc. Pec. Méx. 30:45-51
- Hernández, L.J.J., Hernández, C. y Ruiz, R. 1982. Sincronización del es-- tro en borregas mediante la utilización de esponjas vaginales im-- pregnadas de acetato de fluorogestona o implantes subcutáneos usa-- dos del progestágeno SC21009. Téc. Pec. Méx. 43:9-14
- Hernández, L.J.J., Lozano, D.F., Martínez, F.P., Román, P.H. y Castillo, R.H. 1982. Efectos estacionales en las características seminales - de borregos Tabasco mantenidos en clima tropical. Téc. Pec. Méx. - Supl. 8:7-15

- Hinshelwood, M.M., Nelson, E.A., Burril, M.J. and Drobnis, E.Z. 1980. --- Effects of diluent, washing and equilibration time on progressive motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen ram semen. Proc. West. Sec. Am. Soc. Anim. Sci., 31:181-183
- Hulet, C.V. and Sheldon, M. 1980. Sheep and goat. In : Reproduction in -- farm animals. Hafez E.S.E. 4th. ed. Lea & Febiger, Philadelphia. -- 346-357
- Inskeep, E.K. 1974. Artificial insemination and preservation of ram semen In : Artificial insemination in sheep. West Virginia University -- Agricultural Experimental Station. Bull. 629:5-28
- Islam, AB, M.M. and Land, R.B. 1977. In : Footo, R.H. 1984, General evaluation of male reproductive capacity. 10th, Inter. Congr. Anim. - Reprod. A.I. Illinois, Vol; 4: X-1
- Jainudeen, M.R. 1980. The reproductive failure in females. In : Reproduction in farm animals, Hafez E.S.E. (ed) 4th, ed. Lea & Febiger. -- Philadelphia.
- Jalil, A.J.C. 1984. Principales razas ovinas criadas o de interes para MEXICO. En : Memorias del curso Bases de la Crfa Ovina, Toluca, MEX
- Johnson, P.E., Flipse, R.J., and Almquist, J.O. 1955. In : Jones, R.C. - 1969. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow -- milk for storing ram spermatozoa at 37, 5 and -79°C. Aust. J. Biol. Sci. 22:983-994
- Jones, R.C. 1969. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37, 5 and -79°C. Aust. J. Biol. Sci. 22:983-994
- Jones, R.C. and Martin, I.C.A. 1973. The effects of dilution, egg yolk -- and cooling to 5°C on the ultra structure of ram spermatozoa. J. - Reprod. Fert. 35:311-320
- Kalev, G., Marinov, P., Zagorsky, D., Kitchev, G., Bak'rdzhiev, K. and -- Zhekov, G. 1970. Effect of some diluents on viability of deep-frozen ram spermatozoa. Veterinarnomed, Nauk; 7, 31 (Anim. Breed. --- Abstr. 40, 608)
- Kalev, G., Zagorski, D. and Zakhariev, O. 1971. Deep freezing of ram semen. Anim. Breed. Abstr. 40:25
- Kareta, W., Pilch, J. and Wierzbowski, S. 1971. The freezing of ram semen at low temperatures. III. The fertility of ewes after insemination with frozen semen. Med. Vet. 27:734 (Abstract)

- Kareta, W., Pilch, J. and Wierzbowski, S. 1972. Fertility of frozen ram semen diluted in citrate added bull seminal plasma or not. Proc. VIIth. Int. Congr. Anim. Reprod. 2:1479 (Abstract)
- Kennaway, D.J., Obst, J.M., Dunsten, E.A. and Friesen, H.G. 1981. Ultra---dian and seasonal rhythms in plasma gonadotropins, prolactin, cortisol and testosterone in pinealectomized rams. Endocrinology. 108: 639-646
- Knight, T.W. 1974. Effect of oxytocin and adrenaline on semen output of rams. J. Reprod. Fert. 39:329-336
- Land, R.B. 1973. The expression of female sex-limited characters in the male. Nature. 241:208-209
- Langford, G.A., Marcus, G.J., Hackett, A.J., Ainsworth, L., Wolynetz, M.S. and Peters, H.F. 1979. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. Can. J. Anim. Sci. 59:685-691
- Langford, G.A., Ainsworth, L. and Wolynetz, M.S. 1982. Reproductive response of progesterone-treated sheep in confinement to a single and double insemination. J. Anim. Sci. 54:12-17
- Langford, G.A., Marcus, G.J. and Batra, T.R. 1983. Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progesterone-treated sheep. J. Anim. Sci. 57:307-312
- Lapwood, K.R., Martin I.C.A. and Entwistle, K.W. 1972. The fertility of Merino ewes artificially inseminated with semen diluted in solutions based on skim milk, glucose or ribose. Aust. J. Agric. Res. 23:457-466
- Lardy, H.A. and Phillips, P.H. 1939. Preservation of spermatozoa. Proc. 32nd. Meet. Am. Soc. Anim. Prod. 219-221
- Lightfoot, R.J. and Salamon, S. 1970a. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. J. Reprod. Fert. 22:385-398
- Lightfoot, R.J. and Salamon, S. 1970b. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. II. The effects of method of insemination on fertilization and embryonic mortality. J. Reprod. Fert. 22:399-408
- Lincoln, G.A. 1979. Photoperiodic control of seasonal breeding in the ram. Participation of the cranial sympathetic nervous system. J. Endocr. 82:135-147
- Lincoln, G.A. and Ebling, F.J.P. 1985. Effect of constant release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. J. Reprod. Fert. 73:241-253

- Lincoln, G.A. and Fraser, H.M. 1979. Blockade of episodic secretion of luteinizing hormone in the ram by the administration of antibodies to luteinizing hormone releasing hormone. Biol. Reprod. 21:1239-1245.
- Linge, F. 1972. Field trials with frozen semen. Fars. Kotsel. 52,12 (Anim. Breed. Abstr. 41, 1679).
- Loginova, N.V. and Zeltobryuh, N.A. 1968. Evaluation of various methods of freezing semen. Outseuodstuo. 14:22 (Anim. Breed. Abstr. 37, 582).
- Loginova, N.V. and Zeltobryuh, N.A. 1972. Survival rate and fertilizing ability of frozen ram semen. Anim. Breed. Abstr. 41:1680
- Luncan, N. 1968. Some aspects of freezing ram semen. Proc. Vith. Int. Congr Anim. Reprod. 2:1615 (abstract).
- Marley, P.B. Richardson, B.A., Brown-Woodman, P.D.C., Martin, I.C.A. and White, I.G. 1976. Prostaglandin supplementation of diluted ram semen in artificial insemination. Preliminary studies. Theriogenology. 6:655
- Marley, P.B., Morris, R.S. and White, I.G. 1977. Concentration of prostaglandins E and F, fructose and glycerylphosphorycholine in ram semen obtained by electro ejaculation or artificial vagina and in vesicular fluid. Theriogenology. 8:33-43
- Martinez, F.P., Ruiz, D.R. y Castillo, R.H. 1979. Sincronización del estro en borregos Tabasco o Pelibuey. Téc. Pec. Méx. 36:28-52
- Mattner, P.E. 1966. Formation and retention of the spermatozoa reservoir in the cervix of the ruminant. Nature. 212, 1479
- Mattner, P.E. and Voglmayr, J.K. 1962. A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electroejaculation. Aust. J. Exp. Agri. Anim. Husb. 3:78-81
- Mattner, P.E. and Braden, A.W.H. 1967. Studies in flock mating of sheep. Fertilization and prenatal mortality. Aust. J. Exp. Agri. Anim. Husb. 7:110-116
- Mattner, P.E., Entwistle, K.W. and Martin, I.C.A. 1969. Passage, survival and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. Aust. J. Biol. Sci. 22:181
- Memon, M.A., Gustafsson, B.K., Graham, E.F. and Crabo, B.G. 1984. Effects of prostaglandin supplementation on frozen-thawed ram spermatozoa. 10th. Inter. Cong. Anim. Reprod. A.I. Illinois. 201
- Mesaros, P., Gamcik, P. and Schyarc, F. 1978. Preserving ram semen. Veterinarstvi. 28:402-404 (abstract) 2966.

- Moore, R.W. and Whyman, D. 1980. Fertilizing ability of semen from rams of high and low prolificacy flocks. J. Reprod. Fert. 59:311-316
- Nath, J. and Patt, J. Jr. 1970. Biochemical changes associated with freezing in ram semen. Cryobiology 6:522-528
- Olafsson, T. 1980. Insemination of sheep with frozen semen. Results obtained in a field trial in Norway. Zuchtgh. 15:50-59
- Orizaga, J.A., Bustamante, G. y Valencia, J. 1982. Efectos del congelamiento sobre la movilidad progresiva y la estructura acrosomal del espermatozoide del Morueco. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 591-592
- O'shea, T. and Wales, R.G. 1966. Effect of casein, lecithin, glycerol and storage at 5°C on diluted ram and bull semen. Aust. J. Biol. Sci. 19:871-882
- Ott, R.S. and Memon, M.A. 1980. Sheep and Goat manual. Society for Theriogenology, 5-12
- Peña, T.F., Hernández, L.J.J., Ruiz, D.R., Villarreal, P.M. y Avila, D.A. 1984. Utilización de acetato de fluorogestona impregnada en esponjas intravaginales e implantes subcutáneos usados de SC21009 para la sincronización del estro en borregos Romney Marsh. Téc. Pec. Méx. 47:82-87
- Phillips, R.W., Schott, R.G., Eaton, O.N. and Simmons, V.L. 1945. Seasonal variations in the semen of sheep and goats. Cornell Vet. 35:227-236
- Pickett, B.W. and Berndtson, W.E., 1978. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle, Salisbury, G.W., VanDermark, N.L. and Lodge, J.R (eds) Freeman-Co San Francisco, 494-554
- Platov, E.M. 1968. The effect of freezing on the content of adenosine-polyphosphates. In: Visser, P. 1974. Recent advances in the deep-freeze preservation of ram semen. S. Afr. J. Anim. Sci. 4:275-288
- Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 164:666
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Rampacek, G.B. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J. Anim. Sci. 34:278-283.
- Quinn, P.J. and White, I.G. 1966. Variation in semen cations and its relation to semen quality and methods of collection. Fert. Steril. 17: 815-825

- Rathore, A.K. 1969. Mid-piece sperm abnormality due to high temperature - exposure of rams Brit. Vet. J. 125:534-538
- Rathore, A.K. 1970. Morphological changes in ram spermatozoa due to hot- room exposure for varying periods. Brit. Vet. J. 126:277-281
- Reveron, R.A.E. 1986. Razas ovinas tropicales y sus características pro- ductivas y reproductivas. Curso Internacional sobre Producción de Ovinos Tropicales. Universidad de Zulia. Maracaibo, Ven.
- Robinson, T.J. 1970. Fertility following synchronization of oestrus in -- the sheep with intravaginal sponges. II. Effect of dose of prog- estogen and rate of absorption. Aust. J. Agric. Res. 21:783
- Saacke, R.G. and White, J.M. 1972. Semen quality tests and their relation ship to fertility. Proc. 4th. Tech. Confer. NAAB, 22-27
- Sahni, K.L. and Tiwari, S.B. 1973. Artificial insemination of sheep with diluted and stored semen in milk diluents. Indian Vet. J. 50:536-539
- Salamon, S. 1964. The effect of nutritional regimen on the potential semen production of rams. Aust. J. Agric. Res. 15:645-646
- Salamon, S. 1970. The survival of ram spermatozoa following pellet freez- ing below -79°C. Aust. J. Biol. Sci. 23:459-468
- Salamon, S. 1971. Fertility of ram spermatozoa following pellet freezing - on dry ice at -79°C and -140°C. Aust. J. Biol. Sci. 24:183-185
- Salamon, S. 1972. Fertility of ram spermatozoa frozen stored for three --- years. Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Munich, 1494-1495
- Salamon, S. 1976. Artificial insemination of sheep. Publicity Press. Ltd. 101.
- Salamon, S. 1977. Fertility following deposition of equal numbers of fro- zen-thawed ram spermatozoa by single and double insemination. Aust. J. Biol. Sci. 28:477-479
- Salamon, S. and Lightfoot, R.J. 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. III. The effects of insemination technique, - oxytocin and relaxin on lambing. J. Reprod. Fert. 22:409-423 -
- Salamon, S. and Marrant, A.J. 1963. A comparison of two methods of arti- ficial breeding in sheep. Aust. J. Exp. Agri. Anim. Husb. 3:72
- Salamon, S. and Robinson, T.J. 1962. Studies on the artificial insemina- --- tion of Merino sheep. I. The effects of frequency and season of in- semination, age of the ewe rams and milk diluents on lambing perfor- mance. Aust. J. Agr. Res. 13:52-68

- Salamon, S. and Visser, D. 1972. Effect of composition of tris based diluents and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Aust. J. Biol. Sci. 25:605-608
- Salamon, S. and Visser, D. 1974. Fertility of ram spermatozoa frozen stored for 5 years. J. Reprod. Fert. 37:433-435
- Salisbury, G.W. and VanDermark, N.L. 1961. Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle. 1st. ed. Freeman and Co. San Francisco. 369, pp
- Salisbury, G.W., VanDermark, N.L. and Lodge, J.R. 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle, 2nd. ed. Freeman and Co. San Francisco. Chap. 13, 14:385-427 .
- Samouilidis, S. 1970. In: Visser, D. 1974. Recent advances in the deep -- freeze preservation of ram semen. S. Afr. J. Anim. Sci. 4:275-278
- Sawyer, G.J. and Knight, T.W. 1975. Detection of embryonic death and observations on resorption and subsequent fertility in the ewe. Aust J. Exp. Agr. Anim. Husb. 15:189-192
- Schindler, H. and Amir, D. 1973. The conception rate of ewes in relation to sperm dose and time of insemination. J. Reprod. Fert. 34:191---196
- Skinner, J.D., Booth, W.D., Rowson, L.E. A. and Karg, H. 1968. The post-natal development of the reproductive tract of the Suffolk ram and changes in the gonadotrophin contents of the pituitary. J. Reprod. Fert. 16:463-477
- Skinner, J.D. and Rowson, L.E.A. 1968. Puberty in Suffolk and cross-bred rams. J. Reprod. Fert. 16:479-488
- Smirnov, I.V., Davidenko, V.M., Shinkarenko, I.S. and Ignatenko, O.I. --- 1978. The effect of some physical and biological factors on freezing of ram semen. Zhivotnovodstve. 5:58-60 (abstract)
- Smith, P.A., Boland, M.P. and Gordon, I. 1978. Conception rate in ewe: -- effect of method of breeding and number of inseminations. J. Agri. Sci. 91:511-512
- Smorag, Z. and Kareta, W. 1974. In: Colas, G. and Courot, M. 1977. Reproduction of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in sheep. Proc. Symp. Manag. Reprod. in Sheep and Goats. Madison, Wisc. 31-40
- Spillet, J.J., Bunch, T.D. and Foote, W.C. 1979. Sheep and the needed -- for new or better meat production animals. International Sheep -- and Goat Institute. Utah University, Logan, Utah. Bull. 1
- Steel, R.G.D., and Torrie, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics. 2nd; ed. McGraw-Hill. Kogakusha.

- Tasseron, F., Amir, D. and Schindler, H. 1977. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. J. Reprod. Fert. 51: 461-462
- Tiwari, S.B., Srivastava, A.K. and Sahni, K.L. 1977. Some metabolic changes in ram semen stored in the milk diluent. Indian. Vet. J. 54:111-115
- Trejo, G.A. 1983. Congelación del semen de carnero en pastillas (pellets). I. Efecto de la congelación sobre la motilidad progresiva, la morfología espermática y la fertilidad. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 110-113
- Trejo, G.A., Soto, G.R., Meria, V.B. y Peña, V.M. 1984. Inseminación en ovinos con semen congelado. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 322-324
- Trejo, G.A., Soto, G.R., Meria, V.B. y Peña, V.M. 1985. Inseminación artificial en ovinos con semen fresco y refrigerado. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 215 (resumen)
- Tung-Yung, L. 1980. Frozen ram semen: fertility field trials in China. Int. Goat. and Sheep. Res. 12:150-155
- Turek, F.W. and Campbell, C.S. 1979. Photoperiodic regulation of neuroendocrine-gonadal activity. Biol. Reprod. 20:32-50
- Tyrrel, R.N., Gleeson, A.R., Ferguson, B.D., O'Halloran, W.J. and Kilgour, R.J. 1979. Evidence and confirmation of late embryo loss in a flock of Merino ewes. In: Sheep Breeding. Tomes, G.L., Robertson, D.E. and Lightfoot, R.J. (eds) 2nd. ed. Butterworths, London. 38:327
- Visser, D. 1974. Recent advances in deep-freeze preservation of ram semen. S. Afr. J. Anim. Sci. 4:275-288
- Visser, D. and Salamon, S. 1975. Fertility of ram spermatozoa frozen in a tris-based diluent. Aust. J. Biol. Sci. 26:515-516
- Visser, D. and Salamon, S. 1974. Fertility following insemination with frozen-thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen. Aust. J. Biol. Sci. 27:423-425
- Watson, P.F. and Martin, I.C.A. 1972. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. J. Reprod. Fert. 28:99-101
- Watson, P.F. and Martin, I.C.A. 1975. The response of ram spermatozoa to preparation of egg yolk in semen diluent during storage at 5 or -196°C. Aust. J. Biol. Sci. 26:927-935
- Watson, P.F. and Martin, I.C.A. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. Aust. J. Biol. Sci. 28:145-152

Watson, P.F. and Martin, I.C.A. 1976. Artificial insemination of sheep: the fertility of semen extended in diluents containing egg yolk - and inseminated soon after dilution or stored at 5°C for 24 or 48 hours. Theriogenology, 6:553-558

Zlatarev, S.T. 1976. Optimal number of spermatozoa for artificial insemination of sheep with semen stored for 24 hours at 0-3°C. VIIIth. Intern. Congr. Anim. Reprod. A.I. Cracow, 1104-1107