

73
2-y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"

PERSPECTIVAS DEL USO DE LAS CONEJAS
COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR
LAS CARACTERISTICAS DEL SEMEN OVINO
FRESCO Y CONGELADO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
MARIA XOCHITL RODRIGUEZ VITE

Director de la Tesis: M.V.Z. Arturo Trejo González

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	4
FISIOLOGIA DEL TRANSPORTE ESPERMATICO EN EL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO	10
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	18
FIGURA 1	23
CUADRO	24
CONCLUSIONES	25
LITERATURA CITADA	27

R E S U M E N

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Estudios Superiores - - Cuautitlán.

Se utilizaron veinte conejas adultas con por lo menos un parto previo, en el momento de iniciar el experimento las conejas no estaban gestantes y eran receptivas a el macho también adulto, todos ellos provenientes del Módulo de Cunicultura perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Se aplicaron siete diversas dosis de Gonadotropinas para inducir la ovulación en las conejas, así como también se utilizó monta directa con el macho estéril para inducir la ovulación en las conejas.

Las conejas se inseminaron intravaginal e intrauterinamente utilizando tanto semen fresco como congelado de un solo carnero, las dosis preparadas tanto para semen fresco como congelado contenian, 100×10^6 de espermatozoides en pajillas de .25 ml.

La inseminación intrauterina se hizo por laparatomía, sacrificando a las conejas en tiempos variables después de la inseminación artificial.

Lavandose los oviductos y los cuernos uterinos con Solución Ringer-Lactato Formalinizada al 2%, para obtener ovocitos y espermatozoides. El líquido provenientes del lavado se revisó en el hematocitómetro para determinar la cantidad de espermatozoides presentes y ovocitos recuperados, que a su vez se tñieron con rosa de bengala al 3% y se observaron en el microscopio de contraste de fase en aumento de 400 X para localizar los espermatozoides en la zona pelúcida.

Los resultados obtenidos en este trabajo experimental y que son descritos posteriormente sugieren que hay que seguir realizando más investigaciones para que en un futuro poder precedir la fertilidad de una muestra seminal antes de aplicarla en ovejas.

En el oviducto derecho se encontraron espermatozoides en el 64.7% de los casos, mientras que en el izquierdo se encontraron en el 52.9% de los casos no existiendo diferencia significativa, ($P > 0.05$).

En el oviducto izquierdo se encontraron más espermatozoides que en el derecho 3660×10^6 , espermatozoides y 2180×10^6 , espermatozoides respectivamente, pero tampoco hubo respuesta significativa ($P > 0.05$).

Teniendo que tomar en cuenta que los bajos resultados en fertilidad no permiten pasar a la práctica cotidiana en el uso de semen congelado.

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

La población ovina en México se encuentra en una etapa crítica pues lejos de aumentar sufre una disminución del 1.076% - anual (Moreno, 1976).

Las causas que ha provocado esta situación son bastante complejas y quizá se pueden encontrar en el reducido apoyo y fomento que han recibido esta especie, la poca información acerca del comportamiento reproductivo de los ovinos en nuestro medio, las fallas en el manejo, la situación que priva en el campo mexicano así como la escasa investigación en esta área.

Analizar la importancia que cada una de las especies ganaderas tienen en el desarrollo económico nacional nos encontramos con que la ovinocultura ocupa uno de los últimos lugares, ya que existe otro tipo de ganadería tecnificada como la bovina y la porcina, persistiendo de carácter subsistencial y de autoconsumo la actividad ovina y caprina. Debido por una parte al reparto agrario que ocasionó una acción en contra de la ganadería ovina, pues la falta de crédito y de --

asesoría técnica en las superficies otorgadas impidieron que esta especie continuara su ritmo evolutivo.

La ganadería ovina debe ser importante y fundamental para la alimentación, además de ser fuente de materias primas para la industria del vestido y del calzado.

En el período virreinal los principales animales traídos a la Nueva España, fueron ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos, bueyes y asnos siendo el ganado ovino el que mejor prosperó, extendiéndose tanto que junto con el vacuno representaron un problema para su alimentación por la necesidad de grandes extensiones de pasto. (Acosta, 1940).

Los ovinos existentes en México, todavía a principios del siglo XIX, no eran de buena raza y menos aún de la raza Merina; en el año 1834, Lucas Aleman, introdujo los ovinos Merino entre otras especies de buena raza (López 1968).

La producción ovina requiere de grandes inversiones y asesoría técnica especializada, ambos recursos importantes para incrementar la población ovina en México.

Estos recursos por lo general no lo poseen los ejidatarios, por lo cual no realizan programas de mejoramiento genético, ni alimenticio para poder mejorar en cantidad y calidad sus rebaños.

Trayendo como consecuencia que haya en México un 91.87% de ganado corriente que se cría con escasa alimentación, posee poca fertilidad y sin mejora en la calidad de carne o lana y el restante 8.13% son animales de raza pura, con un manejo más o menos adecuado.

Se espera que el crédito y la tecnología llegue más ampliamente a los ovinocultores y ganaderos en general, para poder abastecer el mercado interno de proteínas de origen animal y de lana; fibra que además nos dejará impulsar la industria del vestido y del calzado, creará más fuentes de trabajo, se aprovecharan tierras de pasto no arables y se podrían obtener divisas que actualmente se fugan en las importaciones de lana que se han incrementado a 96.47631 Kg. (Anuario Estadístico del Comercio exterior 1930-1970).

La Inseminación artificial es un método de cruzamiento en el cual el semen es obtenido del macho e introducido dentro del tracto reproductor femenino por medio de instrumentos - evitando el contacto directo entre machos y hembras.

Aunque la Inseminación Artificial (I.A.) ha ganado excelente aceptación en la industria del ganado lechero de países más desarrollados, esta sin embargo no ha sido recibida con igual aceptación en la crianza industrial de borregas y - - cabras habiendo diversas razones para esto; frecuentemente el costo de implementos en programas de (I.A.) ha preponderado en el beneficio económico de una industria, la cual - algunas veces operaba sobre algunos márgenes provechosos; - el costo y mantenimiento de crianza de machos, puede ser -- relativamente bajo y las tasas de concepción obtenidas en - el pasado con el uso de semen congelado en borregas y cabras ha sido un factor limitante, no obstante los recientes avances tecnológicos han aumentado la eficiencia de la (I.A.) en borregas y cabras (Evans 1952).

La técnica de Inseminación Artificial en ovinos presenta numerosas ventajas, siendo una de las principales la de realizar el mejoramiento de los rebaños, al utilizar carneros de alto valor genético y poder distribuir las características de estos sementales. (Barrón 1980).

La Inseminación Artificial ha sido utilizada desde los años 1940-1960 en Rusia, la utilización de esta técnica puede — proporcionar de 200-500 corderos de un solo carnero por año, en lugar de los 30-40 que se obtenían de un sólo carnero, — en casos aislados de 1000-5000 corderos y en casos récord — de 12000-16000 corderos productos de un sólo semental en — una estación reproductiva. (Götee et al., 1949).

Mc. Pherson, (1966), Watson, Martin (1972). Señalan entre — las posibles causas de los pobres resultados obtenidos con semen congelado el daño acrosomal por dilución y congelación del semen. Ocasionado por falta de protección de diluentes ordinarios a la célula espermática, durante la congelación (Tasseron et al., 1977)

Así mismo al segmento del aparato genital femenino de la — borrega en donde es depositado el semen (Andersen Amdal 1973).

Debido a la dificultad que presenta el paso del catéter a través del cérvix, ya que la disposición de los pliegues es a la inversa que en otros ruminantes, en la (I.A.) de los ovinos se han utilizado diferentes métodos y estos van desde la inseminación vaginal con la simple introducción del semen hasta la porción anterior de la vagina, hasta la utilización de técnicas quirúrgicas que permiten depositar el semen en oviductos o útero con los grandes inconvenientes de estos métodos (Andersen et al., 1973).

La Inseminación vaginal requiere de un gran número de espermatozoides para lograr regulares resultados de fertilidad, lo cual reduce el número de ovejas servidas por eyaculado, la utilización de la cirugía tiene la desventaja de no ser aplicable a nivel de campo en forma masiva, además de resultar en un bajo número de partos.

Debido a problemas como lo anterior es importante valorar el comportamiento del semen ovino, tomando un modelo más accesible económicamente antes de trabajar en ovinos.

FISIOLOGIA DEL TRANSPORTE ESPERMATICO EN EL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

Existen diferencias en las especies en cuanto al lugar del aparato reproductor femenino, en el cual se deposita el - - eyaculado, siendo el de los ovinos en el extremo craneal de la vagina y en el cuello uterino.

El conocimiento de la tasa de transporte espermático desde el sitio de eyaculación en el tracto reproductor femenino a el sitio de fertilización, es importante en cualquier análisis cronológico de activación y desarrollo pronuclear en -- ovocitos de oveja, la información también estaría apreciada en programas de Inseminación Artificial o Apareamiento Natural.

Se conocen tres etapas en el transporte del espermatozoide en el - aparato reproductor femenino: Transporte Rápido, colonización en los depósitos de espermatozoide y liberación lenta y transporte. (Hafez, 1986).

Transporte Rápido. Esta fase sugiere un transporte rápido de espermatozoides a través del canal cervical con una duración de 2-10 minutos pudiendo facilitarse mediante el aumento de la contractilidad en el miometro y del mesosalpinx -- durante el cortejo y el coito.

Colonización de los Depósitos de Esperma. En las criptas cervicales queda atrapado un número considerable de espermatozoides, haciendo de estas criptas un depósito adecuado -- para el reservorio de espermatozoides, ya que los protege -- de los leucocitos que se encuentran en las secreciones de -- la vagina, satisface las necesidades energéticas de los espermatozoides, filtra los espermatozoides anormales, así -- como participa en la capacitación de los espermatozoides. -- Cuántos más espermatozoides entren en el depósito cervical, más alcanzan el óviducto aumentando las oportunidades de -- fecundación.

Liberación Lenta y Transporte. Los espermatozoides pueden abandonar el cuello uterino mediante motilidad propia o -- transportarse lentamente por la actividad contráctil del -- miometro.

Se han realizado experimentos en los cuales se ha demostrado que el uso de hormonas o tratamientos físicos inhiben el transporte espermático en el aparato reproductor femenino, como es el caso del uso de progestágenos sintéticos para controlar el estro, así como también el uso de prostaglandinas para causar regresión del cuerpo lúteo (Hawk, 1974).

Algunos investigadores, han obtenido resultados, en los que las prostaglandinas actúan favoreciendo la actividad del miometrio y por lo tanto también favorece el transporte espermático antes de la ovulación (Hunter et al., 1982).

Los productos de la ovulación, (esteroides ováricos) pueden estimular el ascenso de los espermatozoides hacia el sitio de fecundación (Overstreet et al., 1979).

Hunter y Nichol (1983), han demostrado que los espermatozoides biológicamente competentes que entran en el oviducto en estros tempranos son retenidos en el istmo durante 17-18 horas y se activan hacia el sitio de fertilización poco antes de la ovulación.

También sugirieron que la motilidad espermática y la motilidad flagelar (+), están influenciadas directamente por la reducción de la temperatura en el istmo antes de la ovulación, - así como las secreciones del istmo pueden también disminuir el metabolismo energético y movimiento espermático.

La congelación también afecta la calidad del semen, ya que el semen ovino es muy susceptible a los cambios bruscos de temperatura y aunque en ocasiones se utilicen los crioprotectores adecuados estos no llegan a proteger toda la membrana del espermatozoide afectando la fertilidad del semen (Martin y Watson, 1976).

(+) motilidad espermática: El espermatozoide mueve el flagelo y avanza (normal) (Foote, 1986).

(+) motilidad flagelar: El espermatozoide agita el flagelo pero no avanza (asociado con espermatozoides viejos) (Foote, 1986).

O B J E T I V O S

- Validar la técnica de determinación del paso de los -- espermatozoides de ovino en el aparato genital de la coneja.

- Determinar el efecto de la inducción de la ovulación -- sobre la capacidad del avance de espermatozoides de ovino en el aparato genital de la coneja.

- Estudiar el efecto de la congelación sobre la vitalidad y transporte de los espermatozoides de ovino en el aparato genital de la coneja.

MATERIAL Y METODOS

Descripción del material biológico utilizado: Veinte conejas adultas con por lo menos un parto previo, en el momento de iniciar el experimento las conejas no estaban gestantes y eran receptivas al macho, también adulto.

Una solución formolada al .4%, Hormona Ganadotropina Coriónica (HCG), y Hormona PMSG, así como semen de ovino fresco y congelado.

Para la elaboración del diluyente se procedió de la siguiente manera: Se pesaron 11 gr. de lactosa en la balanza y se aforaron en una probeta con 100 ml. de agua, calentandose - la probeta con el contenido para disolver la lactosa.

2.9 gr. de Citrato de sodio se aforaron en 100 ml. de agua destilada, a la probeta conteniendo la lactosa se le vaciaron.

	volumen original		volumen total
24.7 ml.	100 ml.	=	75.3 ml.

Para producir la infertilidad en el conejo macho, este se inyectó con la solución formolada al .4% intraepididimalmente .25 ml. en cada testículo, también se utilizó una solución Ringer-Lactato formalinizada al 2% para lavar -- las diferentes porciones del aparato reproductor femenino y obtener tanto los ovocitos como los espermatozoides. - Para inducir la ovulación en las conejas se les aplicaron siete diversas dosis de gonadotropinas, así como también se utilizó la monta directa con el macho estéril en las - conejas.

Combinando la Inseminación Artificial intravaginal con la aplicación de semen congelado se dieron resultados nulos, al no encontrar espermatozoides en el momento de realizar los lavados y ser observados en el microscopio de contraste de fase, sin embargo cuando se realizó la Inseminación Intrauterina utilizando semen congelado a unas dosis de 200×10^6 , se observó una mejor respuesta ya que incluso estas se trabajaron también a diferentes dosis de hormonas.

Esto es la suma de los porcentajes encontrados en ambos oviductos al aplicar diferentes cantidades de hormonas.

Dosis de 12 U.I. de HCG y 24 U.I. de PMSG, encontramos .003% espermatozoides en el oviducto derecho y .0005% espermatozoides en el oviducto izquierdo dando un total de .0035% espermatozoides recuperados.

Dosis de 16 U.I. de HCG y 32 U.I. de PMSG, tuvieron una respuesta de .004% de espermatozoides encontrados, además que se observó un número de 2 espermatozoides adheridos a la zona pelúcida, (figura 1). Lo cual indica que tal vez aumentando la dosis de la hormona con la misma cantidad

del semen congelado se encuentra una mayor respuesta.

Al realizar el experimento con semen fresco con una dosis de 400×10^6 espermatozoides y la aplicación de hormonas de 24 U.I. de HCG y 48 U.I. de PMSG, se obtuvo un mayor número de espermatozoides en el oviducto derecho a razón de .0005% no así en el izquierdo que no se encontró ningún espermatozoide.

La mejor respuesta fué encontrada en el oviducto derecho - .003% y en el izquierdo .0005%, así como también en la segunda dosis de hormona aplicada, se encontró un mayor número de espermatozoides en el oviducto derecho .003% y en el izquierdo fue negativo .00%.

Cuando se aplicaron dosis mayores de semen fresco 894×10^6 de espermatozoides con una dosis de hormona de 30 U.I. de HCG y 60 U.I. de PMSG se encontró un total de .0019% en el momento de hacer los lavados, un número mayor de espermatozoides en el oviducto izquierdo .0016%, que en el derecho .0003%.

Ocurriendo algo similar al aplicar la misma cantidad de — semen fresco pero con una dosis mayor de hormonas 40 U.I.— de HCG y 80 U.I. de PMSG ya que hubo un mayor número de — espermatozoides en el oviducto izquierdo .0016% y en el — derecho .0007% haciendo un total de .0023%.

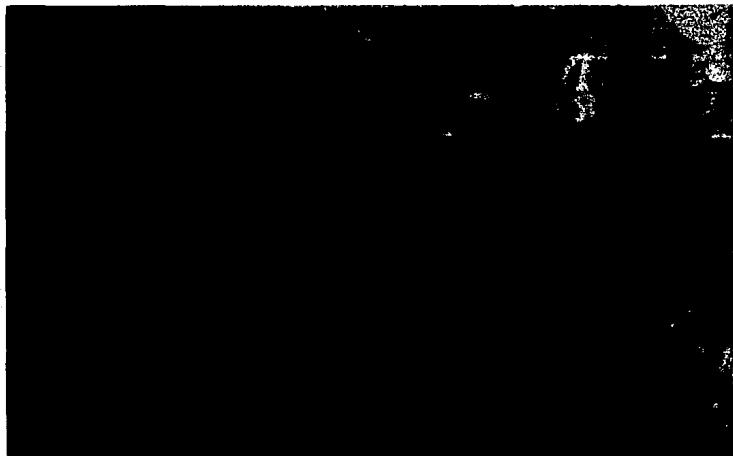
Esto nos da como respuesta que a dosis de 200×10^6 espermatozoides de semen congelado haya una mayor captación de espermatozoides en el oviducto derecho, así como también — la relación existente entre la aplicación de semen fresco a unas dosis de 894×10^6 espermatozoides, con una dosis — mayor de hormonas HCG y PMSG dan una mejor respuesta y que esta se localizó en el oviducto izquierdo en ambas aplicaciones.

Se observa que al incrementar las dosis de espermatozoides se aumenta el número de estos recolectados, pero se reduce el porcentaje de recuperación en relación con el total de espermatozoides aplicados, perdiéndose aproximadamente de tres a cuatro logaritmos en relación a los espermatozoides inseminados.

Aunque el uso del macho infértil fué la mejor respuesta para estimular la ovulación, en el presente trabajo el macho no quedó bien esterilizado por lo que se encontraron espermatozoides de conejo en los ovocitos y estas muestras por lo tanto fueron desechadas.

En el oviducto derecho se encontraron espermatozoides en el 64.7% de los casos, mientras que en el izquierdo se encontraron en el 52.9% de los casos no existiendo diferencia significativa, ($P > 0.05$).

En el oviducto izquierdo se encontraron más espermatozoides que en el derecho 3660×10^6 , espermatozoides y 2180×10^6 , espermatozoides respectivamente, pero tampoco hubo respuesta significativa ($P > 0.05$).



MICROFOTOGRAFIA 400 x MOSTRANDO DOS
ESPERMATOZOIDES OVINOS SOBRE LA ZONA
PELUCIDA DE UN OVOCITO DE CONEJA.

CUADRO 1. TRATAMIENTOS Y RESULTADOS DE LA UTILIZACION DE CONEJAS COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL SEMEN OVINO CONGELADO.

TRATAMIENTO CON GONADOTROPINAS	n	OVULACIONES y/o FOLICULOS	RECUPERACION DE OVOCITOS		TIPO DE INSEMINACION	TIPO DE SEMEN Y CANTIDAD DE ESPERMATOZOI- DES. $\times 10^6$	RECUPERACION DE ESPERMATOZOIDES EN LOS OVIDUCTOS				TOTAL %
							DERECHO		IZQUIERDO		
			n	%			n	%	n	%	
25 UI HCG	2	30	0	0	Intra vaginal	Congelado 200	0	0	0	0	
25 UI HCG 50 UI PMSG	2	13	8	61.5	Intra vaginal	Congelado 200	0	0	0	0	
12 UI HCG 24 UI PMSG	2	14	6	42.8	Intra uterina	Congelado 200	6000	0.003	1000	0.0005	0.0035
16 UI HCH 32 UI PMSG	1	--	1	----	Intra uterina	Congelado 200	6000	0.003	2000	0.001	0.004
24 UI HCG 48 UI PMSG	2	47	0	0	Intra uterina	Fresco 400	2000	0.0005	0	0	0.0005
30 UI HCG 60 UI PMSG	2	28	0	0	Intra uterina	Fresco 894	3000	0.0003	15000	0.0016	0.0019
40 UI HCG 80 UI PMSG	4	55	2	4.6	Intra uterina	Fresco 894	7000	0.0007	15000	0.0016	0.0023

C O N C L U S I O N E S

Dosis diferente de Gonadotropinas favorecieron la respuesta, ovulatoria. Ya que al aplicar dosis bajas de gonadotropinas y compararlas con dosis altas aplicadas, las primeras en general obtuvieron una mayor respuesta, así como también la combinación de HCG y PMSG resultó más efectiva que al aplicar HCG sola.

La inseminación intrauterina facilita el transporte espermático hasta el oviducto.

Los espermatozoides de ovino pueden llegar hasta la zona -- pelúcida de ovocitos de coneja, aplicandolo por inseminación artificial intrauterina.

Los resultados obtenidos nos sugieren que hay que seguir realizando más investigaciones para en un futuro poder predecir la fertilidad de una muestra seminal antes de aplicarla en -- ovejas.

Pudiendo tomar como base a las conejas para poder experimentar en ellas el tiempo que tardarían en transportarse los -- espermatozoides del sitio de eyaculación a el sitio de fecundación, en el aparato reproductor de las ovejas, así como en otras especies.

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

- 1.- Acosta José, Historia Natural y Moral de las Indias, México 1940, p.317.

- 2.- Andersen, K, Amdal, J., Fougner, J.A.; Intrauterine and Deep Cervical Insemination with Frozen Semen in Sheep Zuchtygiene 8;113-118 (1973).

- 3.- Anuario estadístico del Comercio Exterior de los - - Estados Unidos Mexicanos; 1930, 1940, 1950, 1960 y 1970 S.I.C. Dirección de Estadística, Impreso en los talleres gráficos de la nación, México 1930-1970.

- 4.- M.V.Z. Barrón Uribe Carlos, Cursos de Actualización - Sobre Reproducción Ovina p.p. 52-57 Memorias México - D.F. 1980.

- 5.- Foote, R.H. Artificial Insemination. In. *Reproduction in Farm Animals 4th. Lea and Febiger. U.S.A.: 521-545 (1986).*

- 6.- Götte R. *Die Besamung Und Unfruchtbarkeit. Der. - - - Haussäugetiere, M.H., Sharper S7 (1949).*

- 7.- Hafez E.S.E. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales 4a. Edición 1986 p.p. 194-205. México, D.F.*

- 8.- Hawk, H.W. and Conley, H.H., (1974). *Involvement of the Cervix in Sperm Transport Failures in the Reproductive Tract of the ewe. Biol. Reprod. 13: 322-328.*

- 9.- Hunter R.H.F. Bawise L. and King R., (1982). *Sperm Transport Storage and release in the sheep oviduct - relation to the time of ovulation. Br. Vet. J. 138: 225-232.*

- 10.- Hunter R.H.F. and Nichol R., (1983). Transport of spermatozoa in the Sheep Oviduct; preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus J. Exp. Zool. 228: 121-128.
- 11.- López Rosado Diego G., Historia y Pensamiento Económico de México, Editado por la UNAM, México 1968.
- 12.- Martin, I.C.A. and Watson, P.F. Artificial Insemination of Sheeps Effect on Fertility of number of Spermatozoa Inseminated and of Storage of Diluted Semen for up to - 18 hrs. at 5°C Theriogenology 5, 29-35 (1976).
- 13.- Mc. Pherson, J.M.: Extenders and Sperm Metabolism in -- Proc. 1st. Tech. Conf. NAAB p.p. 24 (1966).
- 14.- Moreno Chan, R. Estado Actual y Perspectivas de la Producción Ovina en México, Vet. México, 7-136-141 (1987).

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

- 15.- Oversteet J.W. and Cooper G.W., (1979). Effect of ovulation and Sperm Motility on the migration of rabbit spermatozoa to the site of Fertilization. J. Reprod. Fert. 55: 53-59.

- 16.- Evans. Gareth (1952). Salomons Artificial Insemination of Sheep and Goats p.p. 1-6.

- 17.- Tasseron, F.: Amir, D.; and Shindler, H.: Acrosome - - Damage of Ram Spermatozoa During. Dilution, Coolong - and Freezing. J. Reprod. Fert. 51: 461;462 (1977).

- 18.- Watson, P.F. and Martin, I.C.A.: Comparison of Changes in the Acrosome of Deep-Frozen Ram and Bull spermatozoa J. Reprod. Fert. 28: 99;101 (1972).