

10  
24



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## COMPARACION DE LA FERTILIDAD OBTENIDA EN OVEJAS INSEMINADAS CON SEMEN FRESCO DILUIDO Y SEMEN CONGELADO

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A :

**HECTOR MOISES ALVAREZ PERAL**

ASESOR: MVZ. ANTONIO ORTIZ HERNANDEZ



MEXICO, D.F.

1989





## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
HIPOTESIS Y OBJETIVO.....	6
MATERIAL Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	10
DISCUSION.....	11
CUADROS.....	14
LITERATURA CITADA.....	15

## RESUMEN:

ALVAREZ PERAL HECTOR MOISES. Comparación de la fertilidad obtenida en ovejas inseminadas con semen fresco diluido y semen congelado. Bajo la dirección del MVZ. Antonio Ortiz Hernández.

El mes de Septiembre de 1987, en el poblado de Topilejo, delegación de Tlalpan en México, D.F. con un clima semifrío - subhúmedo a  $19^{\circ}12'$ , latitud norte y  $99^{\circ}09'$ , longitud oeste, se realizó una comparación de la fertilidad obtenida en ovejas inseminadas con semen fresco diluido y otras inseminadas con semen congelado, para este propósito se sincronizó el estro de las ovejas utilizando acetato de melengestrol por vía oral, mezclado en el concentrado por 14 días, en una dosis de 0.22 miligramos al día por animal, posteriormente se formaron dos grupos al azar de treinta animales cada uno y fueron inseminados cervicalmente al presentar el segundo calor después de terminar el tratamiento.

En el grupo de semen fresco diluido se utilizó una carga de espermatozoides de  $150 \times 10^6$  en 0.25 ml. por dosis, resultando un 66.66% de fertilidad.

El grupo inseminado con semen congelado empleó una dosis de 0.25 ml. con  $300 \times 10^6$  espermatozoides y una temperatura de descongelamiento de  $36^{\circ}C$  durante ocho segundos, obteniendo una fertilidad del 40%.

La fertilidad fue mayor en las hembras inseminadas con semen fresco diluido en relación a las inseminadas con semen congelado, con una diferencia del 26.66% entre las dos variables.

Se considera que deberán hacerse más estudios relacionados para mejorar los métodos de sincronización, dilución e inseminación y así mejorar los resultados.

## INTRODUCCION:

La inseminación artificial (I.A.) en los ovinos es una herramienta aplicable a los sistemas de reproducción modernos, por ofrecer ventajas como son, la mejor utilización de carneros de alto valor genético al lograr un mayor número de hembras gestantes y obtener más corderos de estos sementales, además, también se pondría al alcance de los productores de escasos recursos, el mejoramiento genético de sus rebaños mediante el servicio de I.A. sin tener que comprar un carnero de alto costo. El aspecto de sanidad es otra razón para utilizar la inseminación artificial, ya que el sistema de reproducción tradicional propicia la distribución de enfermedades que causan fuertes pérdidas económicas, pues los productores se prestan o rentan a los sementales para las montas de los hatos sin tener ningún control sanitario con estos. (3, 8, 9).

El biólogo soviético Ilya Ivanovich Ivanov en 1907 fue el primero en desarrollar una técnica aceptable de colección, dilución, almacenaje del semen y de inseminación, este investigador realizó el primer experimento práctico con 4700 ovejas en el año de 1928 en la URSS., desde entonces el número de hembras inseminadas ha aumentado y actualmente se calcula que se inseminan entre 42 y 44 millones de ovejas al año solamente en la URSS. (9, 23, 28).

La inseminación artificial en gran escala se emplea desde los años 1940 a 1960 en la Unión Soviética y se obtienen de 200 a 500 corderos por cada semental anualmente, existiendo algunos casos extraordinarios en que se logra alcanzar de 1000 a 5000 y sucesos record de 12000 a 16000 corderos de un solo carnero, de esta manera se puede realizar un rápido adelanto en la calidad genética de

los hatos utilizando la I.A. (9, 23).

En algunos países como Francia, Australia, Canadá, Nueva Zelanda, Italia y la URSS, la I.A. se practica después de haber sincronizado el estro de las ovejas; por esta razón la técnica de sincronización de estro ha sido tema de interés de muchos estudios (2, 3, 13, 15, 22, 23, 24, 27, 28, 34, 35), pues ofrece ventajas como el hecho de que todos los corderos nazcan en la misma época disminuyendo los costos por concepto de manejo, hay un mejor control de montas o inseminación, provee un seguro y económico número manejable de hembras para la I.A., reduce el número de días en que deba realizarse la inseminación, puede programarse el período reproductivo en el rebaño de acuerdo a la disponibilidad de alimento en cada explotación y se tendrá una mejor comercialización de corderos al vender grupos de animales con edad y peso semejantes. (4, 6, 16).

Los métodos de sincronización de estro en las ovejas pueden dividirse en tres tipos, uno que consiste en inducir la actividad ovulatoria durante la temporada de anestro, otra que sea capaz de inducir luteolisis y una última para inhibir la ovulación hasta que se suspenda el tratamiento. (16).

La tercera opción se basa en el uso de un progestágeno o un análogo de este para evitar la ovulación, el suministro de la droga puede ser por vía oral, vaginal, intramuscular o subcutánea y aplicarse por un tiempo lo suficientemente largo, 12 a 14 días para permitir la regresión del cuerpo luteo en todas las ovejas y al retirar el fármaco las hembras presentan estro de forma sincronizada. (19, 20, 32).

La colección, evaluación y dilución del semen son elementos muy importantes de la I.A. La colección del semen de carnero se realiza por dos métodos principalmente, con un electroeyaculador que proporciona un mayor volumen de semen, pero una menor concentración de espermatozoides, y por medio de una vagina artificial que requiere de un entrenamiento previo del carnero obteniéndose buen volumen y concentración espermática. (9, 18, 26).

Para la evaluación del semen se consideran el volumen eyaculado, la concentración de espermatozoides, su motilidad y morfología. (9, 18).

Se han utilizado a través del tiempo distintos medios de dilución del semen que permiten el almacenaje con el mantenimiento de la habilidad fertilizante de los espermatozoides, en la actualidad esto se ha logrado con buen éxito cuando se realiza en un tiempo menor a 24 horas con semen fresco, e indefinidamente en congelamiento. (14, 28).

Los primeros medios de dilución a base de soluciones buffer fosfatadas usadas por Ivanov en 1907 se manejaban a una temperatura de 30° C o más, una hora antes de utilizarse (28), Colas en 1976 reporta como diluentes en el semen fresco, la leche de vaca y la yema de huevo y para el semen congelado solución Tris -azúcar -yema de huevo y glicerol o en lactosa -yema de huevo -leche y glicerol. (13).

Bharat y Ramamohana (1980) emplearon como diluentes del semen tres distintos medios: Yema de huevo -citrato de sodio, Tris -yema de huevo -glucosa y -Leche de vaca; estos adicionados con 1000 U.I. de penicilina y 1000 microgramos de Dihidroestreptomocina cada uno. (10).

Maxwell (1984) realiza una recopilación sobre el uso de diluentes, encontrando que se utilizan más frecuentemente en el semen fresco medios como la leche de vaca entera o descremada, la yema de huevo y el citrato de sodio o el uso de la yema de huevo con fosfatos buffer. (28).

La fertilidad obtenida en una inseminación cervical depende entre otras cosas del grado de dilución, que estará en función del número de espermatozoides - que tendrá la dosis usada, y aunque el propósito de la dilución es el mayor ahorro de espermatozoides, se deberá tener una mínima cantidad de células viables para obtener un aceptable porcentaje de fertilidad. (14, 28, 29).

**HIPOTESIS:**

Hipótesis nula  $H_0$ : Las hembras inseminadas con semen congelado y descongelado tienen un mayor porcentaje de fertilidad que las inseminadas con semen fresco diluido.

Hipótesis alternativa  $H_a$ : Las hembras inseminadas con semen fresco diluido tienen un mayor porcentaje de fertilidad que las inseminadas con semen congelado.

**OBJETIVO:**

Evaluar la fertilidad en ovejas inseminadas artificialmente con semen fresco diluido y semen congelado.

## MATERIAL Y METODOS:

El trabajo se realizó en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (COPEA), ubicado cerca del poblado de Topilejo, en el kilómetro 29 de la carretera federal México - Cuernavaca en la delegación de Tlalpan, D.F. a 19°12' latitud norte y 99°09' longitud oeste, con una altura sobre el nivel del mar de 2760 metros, un clima semifrío - subhúmedo de una precipitación pluvial en Verano de 800 - 1200 mm/año y una temperatura - media anual de 13°C. (12, 21).

Se utilizaron 60 hembras de distintas razas, Suffolk 18 (30%), Tabasco 15 (25%), Tasset 10 (16.66%), Cruzas 10 (16.66%), y Dorset 7 (11.68%).

Se formaron al azar dos grupos de treinta animales cada uno y se sincronizaron a todas las ovejas aplicando 0.22 miligramos de Acetato de Melengestrol, por animal al día mezclado en el concentrado por 14 días \*, después de finalizado el tratamiento se dejó pasar el primer calor y se inseminó a las ovejas hasta el segundo estro con el fin de obtener mayor índice de fertilidad, la inseminación se realizó con un espéculo pico de pato con iluminación propia, depositando el semen en la entrada del cérvix. (7).

La detección de los estros fue hecha con carneros vasectomizados y con man - diil dos veces al día a las 7 y 17 horas aproximadamente y se inseminó cerca de las doce horas posteriores a la detección. (9, 18, 19).

\* Comunicación personal del MVZ. Teófilo León Quispe Quispe en 1987.

El semen se obtuvo de 8 carneros de diferentes razas: 3 Suffolk, 1 Finnsheep, 2 Dorset, 1 Tabasco o Pelibuey y 1 Tarsset; se realizó por medio de una vagina artificial " Gummi - Bertram - Hannover " modificada, la evaluación del eyaculado fue hecha considerando el volumen, la motilidad espermática tanto del movimiento en masa como del movimiento progresivo, la concentración de espermatozoides y la determinación de anomalías en estos; para esto se usó un microscopio óptico condicionado con una botella plana como templatina con agua a 38 °C y sólo se utilizaron aquellos eyaculados con una concentración mayor a  $2000 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro, con un movimiento progresivo no menor al 60% y con menos del 20% de anomalías morfológicas. (1, 7, 8, 9, 18).

La dilución del semen fresco se hizo empleando como diluyente una solución de citrato de sodio 4.8 g., ácido cítrico 0.4 g. y 100 ml. de agua bidestilada, buscando una concentración de  $150 \times 10^6$  espermatozoides en 0.25 ml. por dosis, que se usó en un lapso no mayor de dos horas. (1, 17).

El método de congelación del semen consistió en lo siguiente:

- 1.- Dilución de 1 : 9 del eyaculado y el diluyente de solución Tris que consta de 36.05 g. de hidroximetilaminometano, 20.24 g. de ácido cítrico, 14.88 g. de fructosa y 100 ml. de agua bidestilada, esto adicionado con un 20% de yema de huevo y el 5% de glicerol. (33).
- 2.- Centrifugación a 300 gravedades por 15 minutos.
- 3.- Resuspensión del paquete de espermatozoides centrifugados, previa eliminación del sobrenadante en una proporción tal que permita obtener una car-

ga de espermatozoides de  $300 \times 10^6$  y el volumen de 0.25 ml. por dosis con el mismo diluyente utilizado en el primer paso.

- 4.- Se envasa el semen diluido en pajillas de 0.25 ml.
  - 5.- Equilibramiento, las pajillas se sumergen en un recipiente de poliuretano con agua a una temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$  y se meten al congelador a  $0^{\circ}\text{C}$  - durante dos horas, que es el tiempo en el que alcanza una temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ .
  - 6.- El congelamiento de las pajillas se hace por exposición a vapores de nitrógeno líquido de éstas por un período de 10 minutos a una distancia de 4.5 - centímetros sobre el nivel del nitrógeno a  $-80^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, ya congelado se introduce directamente al nitrógeno a  $-196^{\circ}\text{C}$  y se almacenan. (30).
- El tiempo de almacenaje del semen que se usó en este trabajo fue de 3 - 4 meses y la descongelación se hizo en un baño María a una temperatura de  $36^{\circ}\text{C}$  - durante 8 segundos (7), después del cual se evaluó nuevamente el semen.

## RESULTADOS:

Los resultados se evaluaron al parto, en un rango de 145 a 155 días después de haber inseminado a las barregas, obteniéndose lo siguiente:

En el grupo de hembras inseminadas con semen fresco diluido, resultó un porcentaje de fertilidad del 66.66%, ya que de treinta parieron veinte animales.

En el grupo inseminado con semen congelado y descongelado se obtuvo un 40% de fertilidad al parir doce de treinta animales.

Los valores conseguidos en este trabajo, van de acuerdo a lo esperado en la hipótesis alternativa  $H_a$ , existiendo una diferencia entre las dos variables del 26.66% a favor del grupo inseminado con semen fresco diluido. (ver cuadro 1).

Para comprobar estadísticamente este resultado se elabora una prueba de hipótesis para diferenciar entre dos proporciones de población (38), teniendo como valor crítico el 1.64 tomado en base a la suposición de que la distribución de la muestra de  $\tilde{P}_2 - \tilde{P}_1$  es normal, con una media de  $P_2 - P_1 \leq 0$  y un error estándar de (0.05), de tal forma que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  y se acepta la hipótesis alternativa  $H_a$ , dado que 3.92 (valor obtenido en la prueba) es mayor que 1.64 ( $3.92 \geq 1.64$ ).

## DISCUSION:

Existen varios factores que afectan los resultados de fertilidad obtenidos en un programa de I.A. en ovinos, como lo son la nutrición, raza, instalaciones, sanidad, clima y latitud; pero limitándonos a considerar los más relacionados directamente a la inseminación, tenemos: La elección de la mejor época de actividad reproductiva de hembras y machos es importante, pues es distinto el índice de ovulación de la oveja a través de los meses del año, debido a la variación del fotoperíodo en los días, esta situación también se presenta afectando la calidad del semen en los machos. (14, 19, 25).

Los métodos de I.A. cambian en muchos aspectos, como el número de espermatozoides viables que deberán emplearse en la dosis inseminada cervicalmente con semen fresco diluido; Maxwell (28) recomienda una dosis mínima de 120 a 125 millones de espermatozoides, argumentando que la I.A. tiene entre sus logros el mayor ahorro de células viables, Colas (14) reporta que en Francia se utiliza normalmente una carga espermática de 500 millones por dosis inseminada, otros autores como Tervit (34) emplea 225 millones y Crosby, Boland y Gordon (15) lo realizan con 400 millones de espermatozoides viables.

En el caso de inseminaciones con semen congelado y descongelado también cambia el número de células viables empleadas, un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Tervit (34) con 450 millones de espermatozoides y Colas (14) con 800 millones. Al usar semen congelado además interviene otro factor como es la temperatura y el tiempo de descongelamiento, en este trabajo se utilizó un tiempo de ocho segundos y 36°C, otro punto relevante que se menciona, es

la importancia del uso del glicerol en este método por evitar la formación de cristales intracelulares que causan la muerte celular. (7).

Orizaga (30) considera que otra de las causas de disminución de la fertilidad es la colocación de la dosis al inseminar, ya que existe un transporte deficiente de espermatozoides, por un trastorno en la actividad ciliar del cérvix debido a que al diluir el semen, también se diluye el total de prostaglandinas seminales que son las encargadas de facilitar el paso de los espermatozoides a través del moco cervical.

Se han elaborado varios trabajos de inseminación artificial en los ovinos bajo diferentes condiciones al realizarlos, por ejemplo:

Hackett, Langford y Robertson (1981) en Canadá con una dosis de 0.5 ml. y  $450 \times 10^6$  espermatozoides en semen fresco diluido, sincronizando el estro de las hembras con dos inyecciones de 15 mg. de prostaglandina F2  $\alpha$  cada una con 11 días de separación y usando animales de distintas razas, logran un porcentaje de fertilidad del 46% al inseminar en el primer calor postratamiento (22) que es menor en comparación al resultado del presente trabajo.

Tervit (1985) reporta haber alcanzado una fertilidad del 17% con semen congelado en pajillas de 0.5 ml. y  $450 \times 10^6$  espermatozoides y el 55% con semen fresco diluido con  $225 \times 10^6$  espermatozoides en 0.5 ml., utilizando ovejas de la raza Parentale sincronizadas con esponjas intravaginales conteniendo 70 mg. de MAP. inseminandolas a las 13 horas después de iniciarse el segundo estro posterior al tratamiento (35) de igual forma resultan menores los porcentajes de fertilidad a los registrados en el presente.

Crosby, Boland y Gordon (1984) sincronizan a 2704 hembras de 87 hatos por tres periodos reproductivos, usando esponjas intravaginales impregnadas con progesterona por doce días y una inyección de 500 UI. de PMSG. al retirar la esponja, e inseminan al primer calor con semen fresco diluido en leche descremada con  $400 \times 10^6$  espermatozoides en 0.2 ml., y obtienen el 71.6% de fertilidad (15) mayor al obtenido en este trabajo.

Aguirre (1978) usó un diluyente de citrato de sodio en un 80% y yema de huevo en un 20% a una proporción de 1 : 4 o 1 : 5 eyaculado y diluyente respectivamente y consiguió una fertilidad del 67.09% en su trabajo (1), ligeramente mayor al alcanzado.

Utesinov y Karimsakov (1984) inseminan 911 ovejas de la raza Kazakh de la raza fina con semen fresco diluido de cameros Finnsheep, Corriedale Australiano y Lithuanian Darkheaded, sin especificar diluyente, ni dosis, ni carga espermática y obtienen el 50.4% de fertilidad al primer servicio (37), que es bajo en relación a los resultados obtenidos en este estudio.

Es notorio que los métodos utilizados son muy variados en su elaboración y resultados y que la inseminación artificial en los ovinos puede ser un auxiliar para ayudar a la situación de la ovinocultura nacional (5, 11, 31), pero se deberán realizar más trabajos de investigación de su potencial en explotaciones de México, para que unido a otros elementos de la producción se llegue a mejorar los resultados.

Cuadro N° 1

Porcentaje de fertilidad obtenido en ovejas inseminadas con semen fresco y congelado

Tipo de Semen	Hembras inseminadas	Hembras paridas	% de fertilidad
Semen fresco diluido con $150 \times 10^6$ espz. en 0.25 ml.	30	20	66.66
Semen congelado con $300 \times 10^6$ espz. en 0.25 ml.	30	12	40.00

## LITERATURA CITADA:

1. - Aguirre, D.V.: Evaluación de la fertilidad obtenida en un programa extensivo de inseminación artificial en ovejas en la zona del Ajusco D.F. tesis de licenciatura de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México 1978.
2. - Ainsworth, L. and Downey B.: A controlled internal drug releasing device - containing progesterone for estrus synchronization in sheep; 10th International congress on animal reproduction and artificial insemination June 10-14 1984, University of Illinois at Urbana - Champaign, Illinois, USA. (1984).
3. - Ainsworth, L., Fiser P., Heaney D., Lanngford G. and Shrestha J.: Intensive Husbandry of Fecund Sheep: Genetics of reproduction in sheep. Edited by Land R. and Robinson D. 399-409, Ottawa, Ontario, Butterworths 1985.
4. - Alvarez, L.: Sincronización de estros y aumento de peso durante la gestación en la oveja Tabasco al pastoreo en trópico húmedo. tesis de licenciatura de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. 1983.
5. - Alvarez, y C.: Situación actual de la ganadería ovina en el país. Eficiencia de la producción ovina. Colegio de Méd. Vet. Zoot. de Hidalgo - Federación de la Unidad Nacional Veterinaria del estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México 1984. 3 - 10. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM (1984).
6. - Angeles, C.S.: Implementación de un programa reproductivo para ovejas. Eficiencia de la Producción ovina. Colegio de Méd. Vet. Zoot. de Hidalgo - Federación de la Unidad Nacional Veterinaria del estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México 1984. 61 - 66. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. (1984).

- 7.- Angulo, M.R.: Determinación de la temperatura y tiempo óptimo para la descongelación del semen ovino. tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1988.
- 8.- Aragón, D.C.: Inseminación artificial en la cabra estudio recapitulativo. tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 1984.
- 9.- Barrón, U.C.: Colección y evaluación del semen de carnero e inseminación artificial. Memorias del curso de actualización aspectos de producción ovina. México, D.F. 1979. 128 - 139. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. 1981.
- 10.- Bharat, C.D. and Ramamohana, R.A.: Preservation of ram semen. Indian Veterinary Journal., 57: 130-134 (1980).
- 11.- Casas, P.V.: Consideraciones económicas de la ovinocultura en México. Memorias del curso de actualización aspectos de producción ovina. México 1979. 13 - 30. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. 1981.
- 12.- Comisión de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL): Cartas Geográficas, México, D.F. (1970).
- 13.- Colas, G. and Courot, M.: Storage of ram semen: Sheep Breeding. Edited by: Tomes, G.D., Robertson, D.E. and Lightfoot, R.J., Butterworths, USA. 1976.
- 14.- Colas, G.: Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. Livestock Production Science, 6: 153-166 (1979).
- 15.- Crosby, T., Boland, M. and Gordon, I.: Field Trials infixed Time sheep A.I. in Irland. British Society of Animal Production Winter Meeting, 99: 26-28 (1984).

- 16.- Cumming, I.A.: Synchronization of ovulation : Sheep Breeding . Edited by :  
Tomes, G.D., Robertson, D.E. and Lightfoot, R.J. ; 403-421. Butterworths ,  
USA. 1976.
- 17.- España, M.S.: Evaluación de la fertilidad en ovejas inseminadas artificialmente utilizando dos dosis de concentración espermática de semen fresco y semen diluido refrigerado. tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1986.
- 18.- Feldman, D.: Evaluación de los sementales. Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas de Hidalgo, Federación de la unidad Nacional Veterinaria del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México 1984. 66-77. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. (1984).
- 19.- Fernández, B.S.: Aspectos reproductivos de la oveja. Memorias del curso de actualización aspectos de producción ovina, México, D.F. 1979. 79-89. -  
Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. (1981).
- 20.- Fuentes, V.: Farmacología y Terapéutica Veterinaria, ed Interamericana,  
México, D.F. 1985.
- 21.- García, M.E.: Modificación al Sistema de Clasificación Climática de --  
Koppen 3a, Offset Larios, México, D.F. 1981.
- 22.- Hackett, A., Langford, G. and Robertson, H.: Fertility of ewes after synchronization of estrus with prostaglandin F2 and artificial insemination. Theriogenology and International Journal of Animal Reproduction, 15: 1981.
- 23.- Jheltorruch, N.: Artificial insemination of sheep in the Soviet Union: Sheep Breeding. Edited by: Tomes, G. and Lightfoot, R. 565-570, Butterworths, USA. 1976.

- 24.- Kaszteland, R., Woyno, W., Borkowski: Poziomy LH prolaktyny progesteronu u owiec poddanych zawierającego progesteron. Medycina Weterynaryjna 38: 299-300 (1982) wojewodzki zaklad weterynarii Lomza, Poland, (1982).
- 25.- Lozano, D.F.: Cambios estacionales en el semen de borrego Tabasco. tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1982.
- 26.- McDonald, L.E.: Reproducción y Endocrinología Veterinarias. 2a ed Interamericana, México, D.F. 1981.
- 27.- Martemucci, G., Manchisi, A., Rifino, F. e Celi, R.: Il controllo ormonale della fecondità negli ovini e gli impianti sottocute di Norgestomel a confronto con i pessari vaginali contenenti FGA. Annali della Facoltà di Agraria, Università di Bari. 31:251-267. (1983).
- 28.- Maxwell, W.M.: Current problems and future potential of artificial insemination programmes: Reproduction in sheep, Lindsay, D., Pearce, D., 300-307. Cambridge University Press. 1984.
- 29.- Maxwell, W.M.: Artificial insemination of ewe with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 2. effect of dose of spermatozoa and site of intra-uterine insemination on fertility. Animal Reproduction Science, 10:309-316 (1985).
- 30.- Orizaga, V.J.: Efecto de la congelación sobre la movilidad progresiva y la estructura acrozomal del espermatozoide del morruco, tesis de licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1982.

- 31.- Pérez, I.A.: Situación actual de la ovinocultura en México. Memorias del curso de actualización aspectos de producción ovina. México, D.F. 1979  
1 - 12 Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. 1981.
- 32.- Robinson, T.J.: Controlled breeding of sheep and goats: Sheep Breeding. Edited by: Tomes, G.D. Robertson, D.E. and Lightfoot, R.J. 423-438, Butterworths. USA. 1976.
- 33.- Simmet, L.: Konfektionierung von Bullenspermien Kunststoffröhrchen nach der Landshuter Methoda. Tierärztl. Umschau., 2:88-90 (1972).
- 34.- Tervit, H.R.: Artificial insemination of sheep in New Zealand. Ministry of Agriculture and Fisheries. Agricultural Research Division. Annual Report. 1982/1983 Wellington, New Zealand (1984).
- 35.- Tervit, H.R.: Artificial insemination in sheep in New Zealand. Ministry of Agriculture and Fisheries. Agricultural Research Division. Annual Report. 1983/1984 Wellington New Zealand. (1985).
- 36.- Trejo, G.A., Soto, G.R., Neria, B. y Peña, V.: Inseminación artificial en ovinos con semen fresco y refrigerado. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985. Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM.:215. México, D.F. 1985.
- 37.- Utesinov, Zh., Karymsakov, K.: The use of frozen semen. Ovtsevodstvo., 9: 37-38 (1984).
- 38.- Wayne, W.D.: Bioestadística Base para el Análisis de las ciencias de la Salud. ed. Limusa. 182-184. México, D.F. 3a 1982.

- 39.- Zamfirescu, S., Barbulescu, I., Oprea, R., Pivoda, C.: Ewe fertility after artificial insemination with frozen or chilled semen . Contrioutii la —  
Imbunatatirea fecunditatii oilor insaminitate artificial cu material seminal congelat si refrigerat Revista de Cresterea Animalelor . Rom. (1982).