

EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD DE OVEJAS INSEMINADAS POR VÍA
INTRAUTERINA CON SEMEN CONGELADO / DESCONGELADO DE
DIFERENTES CALIDADES

GUILLERMO RAIMUNDO CLIFTON

Tesis presentada como requisito para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Curso de post- grado en Producción Animal
Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Mar del Plata
Estación Experimental Agropecuaria de Balcarce – INTA

Balcarce, diciembre 1993

EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD DE OVEJAS INSEMINADAS POR VÍA
INTRAUTERINA CON SEMEN CONGELADO / DESCONGELADO
DE DIFERENTES CALIDADES

Guillermo Raimundo Clifton

INDICE

• INTRODUCCIÓN	1
• REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
• MÉTODOS DE INSEMINACIÓN	5
• INSEMINACIÓN VAGINAL	5
• INSEMINACIÓN CERVICAL	5
• INSEMINACIÓN INTRAUTERINA	6
• RESULTADOS DE PREÑEZ UTILIZADOS CON LAS DIFERENTES TÉCNICAS	8
• DILUYENTES SEMINALES	13
• DESCRIPCIÓN DE LOS DAÑOS PROVOCADOS POR EL ENFRIAMIENTO Y LA CONGELACIÓN	15
• PASAJE DE UNA TEMPERATURA CORPORAL A UNA POR ENCIMA DE LOS 0°C	15
• CAMBIOS QUE OCURREN DURANTE EL ENFRIAMIENTO	16
• PASAJE A TEMPERATURAS MENORES DE 0°C	19
• AGENTES PROTECTORES	20

• YEMA DE HUEVO	20
• LECHE	20
• CRIOPROTECTORES	20
• RESULTADOS OBTENIDOS CON DIFERENTES DILUYENTES	22
• MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE SEMEN	25
• CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	25
• MOTILIDAD MASAL	26
• MOVILIDAD ESPERMÁTICA INDIVIDUAL	26
• MEDIDAS OBJETIVAS DE LA MOTILIDAD	27
• MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD ACROSOMICA	30
• COLORANTE SUPRAVITAL	31
• COLORACIÓN EOSINA - NIGROSINA	31
• TINTA CHINA	32
• TINCIÓN GIEMSA	32
• CONTRASTE DE FASE	32
• MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	

.....	32
• FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA Y LAS ORGANELAS	32
• PRUEBAS BIOLÓGICAS CALIDAD SEMINAL	33
• PRUEBA DE TERMORESISTENCIA	34
• ANÁLISIS MÚLTIPLE CALIDAD SEMINAL	35
• MATERIALES Y MÉTODOS	38
• OBTENCIÓN DE SEMEN	38
• EVALUACIÓN DEL SEMEN ANTES CONGELACIÓN	38
• CONGELACIÓN	39
• EVALUACIÓN IN VITRO DEL SEMEN CONGELADO	41
• MÉTODOS DE EVALUACIÓN IN VIVO	43
• ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
• RESULTADOS	47
• DISCUSIÓN	51
• CONCLUSIONES	55
• BIBLIOGRAFÍA	56

RESUMEN

Existen variaciones individuales en la calidad del semen a la descongelación, algunos de los cuales no cumplen con los requisitos mínimos, provocando una restricción del uso de animales zootécnicamente superiores. Se llevó a cabo un ensayo con diferentes calidades de semen evaluados por medio de la motilidad progresiva rectilínea.

El objetivo del trabajo fue: medir la fertilidad por medio de la tasa de no retorno de ovejas inseminadas por vía intrauterina sobre celo natural con diferentes calidades de semen en función de su motilidad progresiva rectilínea a la descongelación.

De cada animal se congelaron pequeñas porciones del eyaculado en 5 pajuelas a la dosis de 40×10^6 espermatozoides, dos veces por semana. Se caracterizaron los valores de motilidad progresiva rectilínea y la morfología seminal al momento de la descongelación y a las 4 post - descongelación. El semen se descongeló colocando a las pajuelas en agua a 37°C durante 10 segundos. Los animales se seleccionaron a partir de los datos de motilidad progresiva rectilínea a las 4 horas del test de termoresistencia formándose 3 grupos:

A = 20% M.P.R.

B = 7 - 10% M.P.R.

C = 1% M.P.R.

Con este semen congelado se inseminaron por laparoscopia sobre celo natural 48 ovejas por grupo.

El porcentaje de preñez alcanzado por grupo fue de:

A = 65,95%

B = 59,60%

C = 60,41%

Se comprobó, de acuerdo con la hipótesis propuesta, que con el semen que a las 4 horas de incubación presentaba una motilidad progresiva rectilínea de 0,9% tanto como de 20% se consiguió preñar igual número de ovejas.

En este caso en particular el test de termoresistencia no fue un buen predictor de la fertilidad, pero se debe aclarar, que es solo un trabajo, por lo tanto antes de desechar esta prueba deberán realizarse más investigaciones.

SUMMARY

Individual variation in thawed frozen semen causing deficiencies that prevent minimum quality standards to be attained thus restricting the use of zootechnically superior animals have been observed. An experiment was conducted with semen of different qualities evaluated by the percentage of forward moving spermatozoa.

The experiment was designed to measure pregnancy by the non – return rate of intrauterine inseminated ewes in natural estrus with different qualities of semen evaluated by the percentage of forward moving spermatozoa.

A small fraction of semen of each ram was frozen in 5 straws with a dosis of 40×10^6 spermatozoa. Percentage of forward moving spermatozoa and seminal morphology was determined when frozen semen was thawed and 4 hours after thawing. Frozen semen straws were thawed in water at 37° for 10 seconds. Rams were selected according to percentage of forward moving spermatozoa 4 hours after thawing and were separated according into 3 groups,

- A: 20 % forward moving spermatozoa
- B: 7 – 10 % forward moving spermatozoa
- C: 1 % forward moving spermatozoa

Semen from each group was inseminated by laparoscopy in 48 sheep in natural oestrus. The pregnancy obtained in each group was:

- A: 65,95 %
- B: 59,60 %
- C: 60,41 %

Semen of 0,9% and 20% forward moving spermatozoa at 4 hours of incubation after thawing was found obtain equal percentage of pregnant ewes in accordance with the author's hypothesis. In this particular case the motility test was not a good fertility predictor, though in order to discard this test further research will be required.

INTRODUCCIÓN

La intensificación de los sistemas productivos ovinos requiere la máxima utilización posible de los padres genéticamente superiores.

El incremento de la producción de los animales se logra por dos vías: mejorando el ambiente en que viven y su capacidad genética para producir en ese ambiente.

A través del proceso de selección y apareamiento de animales superiores se van produciendo cambios genéticos pequeños pero acumulativos en la producción de las sucesivas progenies (Muller 1984).

La inseminación artificial con semen congelado es una herramienta de trabajo que nos permite intensificar el aprovechamiento de los animales genéticamente superiores y por consiguiente su uso más eficiente.

Entre las ventajas de la inseminación artificial con el semen congelado se observan: - el incremento de la tasa de progreso genético, - permite transportar semen a grandes distancias, - la prevención y control de enfermedades venéreas, - el uso de machos incapacitados físicamente para la cópula, - la concentración del servicio por medio de métodos de inducción y sincronización de la ovulación, - el uso de un reproductor fuera de la época de servicio (Evans y Maxwell, 1987).

La Inseminación artificial en la especie ovina, en el cérvix o en la vagina con semen congelado, se ha visto limitada en su aplicación

práctica por la menor fertilidad que se logra frente a la inseminación con semen fresco (Azzarini, 1987).

Los porcentajes de preñez obtenidos por Maxwell y Hewitt (1986) en ovejas inseminadas artificialmente con semen descongelado fueron del 40% por vía cervical y del 60% por vía intrauterina.

La obtención de mejores tasas de fertilidad depositando el semen descongelado directamente en la luz uterina mediante cirugía, llevó a concluir que el cérvix constituye una barrera que dificulta el pasaje de los espermatozoides que han sido previamente descongelados (Lightfoot y Salamon, 1970a). Esto se debe, fundamentalmente, a las particularidades anatómicas del cérvix de las ovejas que poseen gran cantidad de repliegues y anfractuosidades que lo convierten en una barrera que impide la introducción de cánulas o pipetas de inseminar, como se realiza en bovinos y que además dificulta el transporte espermático.

En consecuencia, el semen debe ser depositado en vagina u orificio vaginal de cérvix, razón por la cual las gametas de las dosis inseminantes sufren una fuerte reducción en su número durante el pasaje por él. Muchos espermatozoides quedan retenidos en las criptas cervicales sin poder alcanzar los cuernos uterinos. Por esta razón y por las alteraciones acrosómicas sufridas en los procesos de congelación y descongelación, la dosis inseminante depositada en el orificio caudal del cérvix debe ser muy grande: 180×10^6 espermatozoides (Evans y Maxwell, 1987).

Killen y Caffery (1982) describieron por primera vez un método alternativo de inseminación mediante el uso de un laparoscopio.

Los requisitos que debe reunir el semen para ser congelado son: - motilidad masal entre 4 – 5, según escala propuesta por Smith (1967), - motilidad progresiva rectilínea no inferior al 70%, - alteraciones morfológicas totales de la célula espermática no superiores al 20% (Tekin, 1982; Palma, 1988).

Las condiciones mínimas que debe reunir un semen a la descongelación son: - 40% de motilidad progresiva rectilínea, 30% a las 5-6 horas, - los acrosomas dañados no deben superar el 70% a las 0 horas de la prueba de termoresistencia (Evans y Maxwell, 1987).

Según Fiser y col., (1987) el semen no debe tener menos del 35% de motilidad progresiva rectilínea a la descongelación y un vigor de 3.

Los trabajos realizados hasta el momento en la Unidad integrada FCA – INTA Balcarce, indican que el semen sometido a test de termoresistencia durante 4 horas a 37°C con valores medios de motilidad progresiva rectilínea de 50% a las 0 horas y 30% a las 4 horas con 45% de malformaciones a las 0 horas resultaron en tasas de preñez del 60% (García Vinet, 1989).

Hasta el momento hay poca información disponible sobre las condiciones que debe cumplir el semen descongelado durante el test de termoresistencia para que sea considerado apto para la inseminación intrauterina. La mayor parte de la información disponible se refiere al

semen que es utilizado en inseminación por vía cervical. Al cambiar el sitio donde se lleva a cabo la inseminación artificial hacia craneal, los requisitos mínimos que debe cumplir el semen a la descongelación podrían ser reconsiderados.

Por otra parte, hay variaciones individuales en la calidad del semen a la descongelación (Neves, 1980), algunos de los cuales no cumplen con los requisitos anteriormente mencionados, provocando una restricción del uso de los animales zootécnicamente superiores.

Por lo expuesto anteriormente, se propuso llevar a cabo un ensayo con diferentes calidades empleando la motilidad progresiva rectilínea como criterio de su aptitud. A fin de poner en evidencia las posibles diferencias cualitativas entre los grupos empleados. Se utilizaron dosis inseminantes con concentraciones espermáticas reducidas para evitar un efecto cuantitativo compensatorio.

Se planteó la hipótesis de que no hay diferencias en la eficiencia de tres (3) calidades de semen empleados en la inseminación artificial de ovejas sobre celo natural.

El objetivo del trabajo fue medir la preñez por medio de la tasa de no retorno de ovejas inseminadas por vía intrauterina sobre celo natural con diferentes calidades de semen según su motilidad progresiva rectilínea después de 4 hs. de la congelación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

MÉTODOS DE INSEMINACIÓN

La inseminación artificial es una técnica reproductiva en la cual las células sexuales masculinas (espermatozoides) son descargadas en el tracto genital femenino con la ayuda de medios mecánicos que sustituyen los órganos del macho (Durán del Campo, 1980).

De acuerdo al lugar donde se deposita el semen la inseminación artificial se puede clasificar en vaginal, cervical, intraperitoneal e intrauterina.

Estas técnicas difieren en complejidad y posibilidad de realización (Maxwell, 1984).

El éxito de la inseminación artificial depende de un uso correcto de las técnicas artificiales disponibles.

➤ **Inseminación Vaginal:**

La técnica consiste en depositar el semen en fondo de vagina sin intentar localizar el cervix.

➤ **Inseminación Cervical:**

La técnica consiste en depositar el semen en el cervix de la oveja.

El vaginoscopio se introduce hasta el fondo de la vagina en cuya proximidad se localiza el cérvix.

En los animales jóvenes es común que los músculos constrictores o vaginales dificulten su pasaje, en tal caso se requiere mantener presionado el vaginoscopio pero sin hacer fuerza, hasta que estos músculos se relajen.

Un vez localizado el cérvix, el inseminador realiza movimientos de rotación, laterales o de ascenso y descenso de la punta de la pipeta para poder introducirla unos centímetros dentro del cérvix hasta hacer tope, momento en que retira la pipeta de inseminar y la descarga.

➤ **Inseminación Intrauterina:**

La inseminación artificial intrauterina se realiza de tres maneras diferentes:

A) Por medio de laparotomía:

Se realiza el abordaje quirúrgico de la cavidad abdominal, por la línea media, a unos centímetros por delante de la ubre. El semen es depositado dentro de la luz uterina por medio de una pipeta de vidrio con punta muy fina (Lighthfoot y Salomón, 1970 b).

B) Por un método no quirúrgico a través del cervix:

El método consiste en depositar el semen en el útero

introduciendo un aguja de punta roma o un catéter a través del cérvix. Esta técnica fue desarrollada por Andersen, Aamdal y Fougner en 1973 y utilizada por Fukui y Robert en 1976 quienes también utilizaron un espéculo bivalvo, una pinza atraumática para cirugía de 30 cm de largo y una pipeta de inseminar, a la que agregaron una aguja hipodérmica 17 de 10 cm de largo con la punta redondeada.

C) Por medio de laparoscopia:

- Al comienzo de la década del 80 la laparoscopia se utilizaba para observar in situ los ovarios, oviductos y cuernos uterinos, entre otros órganos. A partir de ese año se comenzó a usar en inseminación intrauterina (Killen y Caffrey, 1982; Walker y col, 1984; Maxwell, Butler y Wilson, 1984; Azzarini y Valledor, 1987).

RESULTADOS DE PREÑEZ OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES TECNICAS

Pocos son los trabajos que comparan el servicio natural con la inseminación artificial.

Duran del Campo (1980) estableció una diferencia del 10% en el porcentaje de preñez a favor de la monta natural contra la inseminación artificial vía cervical con semen fresco. Además cita autores neocelandeses que encontraron un 80% de preñez para monta natural, durante un celo contra un 65% de preñez con inseminación cervical con semen fresco durante igual periodo con una sola inseminación.

Por otra parte Dziuk, Lewis y Moyer (1972) concluyeron que las manipulaciones efectuadas en las inseminaciones artificiales producen un 21% menos de preñez que el servicio natural.

Esta reducción en el porcentaje de preñez producida por la inseminación artificial vía cervical con semen fresco estaría influenciada por el momento de inseminación, la manipulación del semen, la dosis inseminante y la habilidad del inseminador (Maxwell, 1984).

El celo de una oveja dura alrededor de 12 horas; durante ese lapso puede ser cubierta con monta natural en varias oportunidades por el mismo o diferentes carneros. Esto explicaría la diferencia a favor de la monta natural.

Kerton y col. (1984) inseminaron por vía intrauterina, cervical y

vaginal a ovejas sincronizadas durante doce días de esponja intravaginal impregnadas con progestágeno (Repromap) y una inyección de 300 I.U. de PMSG al retirar la esponja. La inseminación se efectuó con semen fresco obtenido por medio de electroeyaculación a las 48 y 54 horas de retirada la esponja. Los autores lograron un 56% de preñez con la inseminación intrauterina, 53% con la cervical y un 31% con la vaginal.

La técnica de inseminación vaginal se encuentra poco difundida en el mundo; se utiliza cuando existe un gran número de animales para inseminar con altas dosis de semen fresco (Maxwel, 1984).

Cuando a los animales jóvenes no se les puede introducir el vaginoscopio, se insemina con la técnica vaginal con dosis inseminantes dobles o triples (Evans y Maxwell, 1987).

El método cervical más utilizado es con semen fresco (diluido o no) enfriado. Cuando se emplea el semen fresco sin diluir, la técnica se ve limitada por el tiempo. El eyaculado debe ser utilizado inmediatamente después de su extracción porque su motilidad se reduce rápidamente. Si las ovejas se encuentran distantes de los carneros y se requiere transportar el semen, este puede ser diluido y refrigerado, su fertilidad, sin embargo, declina después de las 24 hs. de reservado.

Salomon y Robinson (1962) alcanzaron tasas de preñez de alrededor del 70% con semen fresco e inseminación cervical mientras que con la misma técnica, pero utilizando semen congelado, sólo alcanzaron el 40%.

Otro punto a tener en cuenta cuando se trata la inseminación cervical es la dosis inseminante.

Evans y Maxwell (1987) consideran que la dosis óptima de semen fresco debe ser de 50×10^6 espermatozoides ya que con dosis mayores no observaron diferencias en los porcentajes de preñez al aumentar la concentración (hasta 400×10^6 espermatozoides por dosis).

Anderson, Aamdal y Fougner (1973) inseminaron ovejas con semen congelado con una concentración de 500×10^6 espermatozoides por ml.

Las inseminaciones intrauterinas por vía cervical en ovejas sincronizadas con esponjas impregnadas con progestágeno (acetato de clormadinona 30 mg, mestianol 1mg.) durante 14 días de I A alcanzaron 54% de preñez obtenido fue del 89%. Con ovejas inseminadas por vía cervical lograron 27% de preñez sobre celo sincronizado y el 45% sobre celo natural.

Fukui y Roberts (1976) compararon tres diferentes formas de inseminación: - cervical con semen fresco, con lo que obtuvieron un 64% de preñez; - intrauterina vía cervical con semen congelado, con lo que obtuvieron un 51% de preñez y - cervical con semen congelado con lo que alcanzaron un 19% de preñez. En el mismo trabajo los autores evaluaron las tasas de no retorno y parición y concluyeron que no existe una mortalidad embrionaria de importancia producida por esta técnica. Además, el porcentaje de ovejas a las que se les puede practicar la inseminación intrauterina por vía cervical es del 46%. Por su parte Anderson y col (1973) lograron penetrar el cérvix hasta el útero con la

pipeta de inseminar en el 62% de las ovejas.

Este método de inseminación intrauterina por vía cervical requiere muchas horas de trabajo y personal sumamente entrenado.

Salamon (1977) comparó en ovejas la fertilidad obtenida con diferentes dosis de semen congelado: 90, 180 y 360×10^6 espermatozoides móviles en 0,15 ml. Realizó una inseminación simple a las 12-14 h de detectado el celo y una doble a las 23-25 h de detectado el celo. Todas las ovejas fueron sincronizadas con esponja intravaginal y utilizó el segundo estro luego de la sincronización. El celo se detectó cada 12 horas con carneros vasectomizados. El autor no halló diferencias significativas entre una o dos inseminaciones. Con la dosis de 360×10^6 espermatozoides móviles obtuvo un 58% de preñez.

Colas (1979) obtuvo 61% de preñez luego de la inseminación de ovejas en otoño, con semen congelado descongelado en una sola inseminación cervical de 800×10^6 espermatozoides a las 55 horas de retiradas las esponjas intravaginales. Los animales fueron sincronizados con fluoroacetato de progesterona y una inyección intramuscular de PMSG al retirar la esponja.

Maxwell y col. (1980) inseminaron por vía cervical con semen congelado en pastillas, conteniendo 200×10^6 espermatozoides en un volumen de 0.2 ml., con una doble inseminación. Las ovejas fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con medroxiprogesterona durante 14 días; al retirar las esponjas se les aplicó 600 I.U. de PMSG. La inseminación doble se realizó a las 50 y 60

horas de retiradas las esponjas obteniéndose 52% de preñez.

Maxwell, Butler y Wilson (1984) Lograron 54% de preñez con inseminación intrauterina por medio de laparoscopia con semen conelado en pastillas, las ovejas fueron sincronizadas durante 14 días con esponjas intravaginales (30 mg de cronogest) y 400 IU de PMSG al retirar las esponjas. La dosis inseminante fue de 20×10^6 espermatozoides en un volumen de 0,02 ml aplicada después de 60 horas de retirada la esponja.

Haresign y Read (1986) inseminaron con la misma técnica con semen congelado ovejas sincronizadas durante doce días con esponjas intravaginales impregnadas en acetato de fluorogestona a las que se les aplicó una inyección de 500 IU de PMSG al retirar las esponjas. La inseminación se efectuó a las 60 horas de retiradas las esponjas con una dosis de 46×10^6 espermatozoides alcanzando 36.7% de preñez.

Maxwell (1986) inseminó intrauterinamente por vía laparoscópica, con semen congelado, a ovejas previamente sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 30 mg. de acetato de fluorogestona más 400 IU de PMSG al retirárseles las esponjas. La tasa de preñez alcanzó el 53%.

Hunton (1987) inseminó con la misma técnica empleando semen congelado, a ovejas sincronizadas con esponja intravaginal logrando un 54% de preñez.

Azzarini y Valledor (1988) inseminaron ovejas sobre celo natural,

de la misma forma, con semen congelado en pastillas logrando un 53% de preñez en borregas y un 43% de preñez en adultas. Cuando los autores inseminaron con la misma dosis (36×10^6 espermatozoides) vía cervical obtuvieron un 8% de preñez con borregas y un 9% de preñez con ovejas adultas.

DILUYENTES SEMINALES

Diluyentes seminales son sustancias que por sus características nutritivas y protectoras prolongan el tiempo de viabilidad y con ello la capacidad fecundante del semen sustituyendo al plasma seminal.

Según Memon y Ott (1981) un buen diluyente debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Proveer nutrientes como fuente de energía
- Proveer un sistema buffer que prevenga los daños que se producen por el cambio de pH por la formación de ácidos lácticos.
- Mantener la presión osmótica y el balance eletrolítico.
- Contener antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano.
- Incrementar sustancialmente el volumen del semen para que las inseminaciones múltiples puedan ser realizadas.
- Contener constituyentes que protejan al espermatozoide contra el daño que produce el enfriamiento y la congelación si este debe ser conservado a baja temperatura.

Generalmente los diluyentes están compuestos por tres

componentes:

a) Azúcares: glucosa, fructosa, lactosa, rafinosa, como fuente de energía que además sirven para mantener la isotonicidad en el eyaculado.

b) Sustancias buffer: fosfato, ácido cítrico, tris hidroximetilaminometano, etc. para mantener el PH del medio constante.

c) Elementos para proteger a los espermatozoides en la etapa de enfriamiento y congelación como puede ser leche, yema de huevo, glicerol, etc.

Antiguamente, de acuerdo al tiempo que se deseaba conservar un eyaculado, se utilizaban diferentes tipos de diluyentes. Si se deseaba conservar un semen a 20-25°C durante 6-10 días se podía utilizar diluyente IVT o CUE (Salisbury y Vandermarck, 1964); ellos se basan en la sobresaturación con dióxido de carbono para disminuir el metabolismo celular. Para conservar el semen a 5°C durante 24 horas- que se denomina semen enfriado o refrigerado – se utilizaba leche descremada o diluyente de Philipis y Lardy (Salisbury y Vandermark, 1964).

Para almacenar semen durante un tiempo más largo éste debe sufrir el proceso de congelación y para esto a los diluyentes comunes se les añade glicerol como crioprotector (la cantidad varía según la especie).

Las temperaturas de congelación se loran de diferentes formas, por ejemplo – 70°C con hielo seco, - 80°C con alcohol refrigerado con

hielo y -196°C con nitrógeno líquido.

DESCRIPCION DE LOS DAÑOS PROVOCADOS POR EL ENFRIAMIENTO Y LA CONGELACION

Según Alberio (1979) la conservación de los espermatozoides por medio del frío implica el encadenamiento de diferentes procesos, para comprenderlos mejor los dividiremos en 2 etapas diferentes:

I- El pasaje de la temperatura corporal a una superior a 0°C (0 4°C): **enfriamiento**.

II- El pasaje de temperaturas superiores a 0°C a temperaturas inferiores a los 0°C : **congelación**. Esta desencadena dos procesos fundamentales: la deshidratación celular y la formación de hielo intracelular.

I- Pasaje desde una temperatura corporal a otra por encima de 0°C :

En primer lugar ocurrirá el pasaje del agua intracelular desde un estado líquido a otra estructura más firme, a esto se lo llama "cambio de fase". El cambio de fase provoca una interrupción de la acción enzimática lo que a su vez altera el metabolismo celular.

El proceso de alteración metabólica se inicia a temperatura de 12°C . El cambio de fase se producirá en la porción lipídica del complejo enzimático de las membranas celulares. Las consecuencias físicas del

cambio de fase se observan al producirse el espesamiento de los lípidos de las membranas celulares provocando una contracción de las mismas con la formación de grietas y un consecuente aumento de la permeabilidad celular. Esto a su vez altera el llamado "equilibrio de flujo" de los lípidos, lo cual conduce a un desplazamiento desordenado de cationes.

La membrana celular ve alterado su "estado de estabilidad" para la temperatura corporal debiendo adquirir un nuevo "estado estable" para menor temperatura. Este proceso necesita tiempo (no es inmediato) por lo que si el enfriamiento es rápido no hay tiempo para la readaptación.

Cambios que ocurren durante el enfriamiento:

a) Morfológicos: las organelas generalmente dañadas por el chock de frío (enfriamiento) son: la membrana plasmática, el acrosoma y las mitocondrias. El daño que ocurre en el acrosoma durante la etapa de enfriamiento, congelación y descongelación, pueden ser estimados con la ayuda del microscopio de luz por medio de un extendido seminal y la tinción del mismo o sin teñir con un microscopio de contraste de fase. Para determinar el daño se puede utilizar la siguiente escala (Watson y Martin. 1972):

- 0: acrosoma normal
- 1 y 2: diferentes estadios de daño acrosómico siendo 2 el más severo.
- 3: acrosoma enteramente desprendido.

También puede clasificarse en: - normal, - inflamado, - rugoso, - desviado, - desprendiéndose y - desprendido.

El daño acrosómico también puede ser estimado por pruebas que miden la actividad enzimática. Cuando se rompe el acrosoma se liberan sus enzimas, por ejemplo la hialuronidasa.

El shock de frío altera la permeabilidad de la membrana celular que luego puede fracturarse o romperse; posteriormente se dañan los acrosomas. En cuanto a las mitocondrias, el shock de frío provoca que algunas sufran giros, se encuentren descoloridas, que otras pierdan sus estructuras internas y su contenido, mientras que otras permanecen inalteradas (Watson, 1981).

b) Motilidad: El shock de disminuye la motilidad por alterar la permeabilidad de la membrana espermática por lo cual pierden (fugan) muchos de los constituyentes intracelulares incluyendo algunas enzimas y coenzimas. Existe también un incremento intracelular de las sustancias del plasma seminal (Karagiannidis, 1976).

c) Liberación enzimática: Harrison y White (1972). Observaron la pérdida de dos enzimas glucolíticas: la isomerasa fosfatasa glucosa y la deshidrogenasa lactasa (LDH) en espermatozoides que habían sufrido shock de frío. Esto sugiere que el metabolismo de los carbohidratos sufren una disminución de la glucólisis y de la actividad respiratoria disminuyendo la fructólisis; los niveles de adenosintrifosfato se encuentran también disminuidos por el shock de frío y no son

resintetizados (Watson, 1981).

d) Circulación iónica: El enfriamiento produce en el espermatozoide un ganancia intracelular del zinc y sodio y pérdida de los iones potasio (Hood, 1970); el magnesio también disminuye intracelularmente.

El espermatozoide ovino acumula, además, iones de calcio como consecuencia del shock de frío (Quinn y White, 1966). Según Karagiannidis (1976) el shock de frío causa una elevación de la concentración de iones calcio y sodio en el interior de la célula espermática y un decrecimiento en las concentraciones de magnesio y potasio. Estos cambios en la circulación iónica producidos por el enfriamiento alteran la actividad metabólica del espermatozoide.

La tasa del enfriamiento tiene un efecto importante sobre los cambios de circulación iónica. El enfriamiento rápido causa las alteraciones mencionadas mientras que cuando es lento esos cambios no ocurren.

e) Pérdida de lípidos y polisacáridos: Los lípidos intracelulares fueron hallados en el medio extracelular luego del enfriamiento, esto indica las células espermáticas sufren una alteración de la membrana espermática (Quinn y col. 1966; Watson, 1981).

II- Pasaje a temperaturas menores de 0°C:

Según Alberio (1979) ocurren dos procesos fundamentales en esta etapa:

- 1) Deshidratación celular**
- 2) Formación de hielo intracelular**

1) La deshidratación celular se produce como consecuencia de la congelación del medio extracelular, lo cual por diferencia de presiones induce a la salida de agua de la célula. La consecuencia más importante es el aumento en la concentración de electrólitos intracelulares alterando el equilibrio iónico. Al mismo tiempo la cristalización disminuye la propiedad de absorción de las sales por el agua provocando una disminución del pH, lo que contribuye a la coagulación y/o precipitación de proteínas con los consecuentes daños de las estructuras celulares. Esto también producirá una modificación de la presión osmótica intracelular distinta a la del medio externo creando diferencias de presión vulnerando las membranas.

La congelación produce también una disminución del volumen celular que al llegar a niveles críticos también conduce a una destrucción de la membrana celular.

2) La formación del hielo intracelular da origen fundamentalmente a problemas de orden mecánico provocando el estallido celular y dañando estructuras protoplasmáticas por acción de los cristales de hielo.

La velocidad con que se lleven a cabo los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación de la célula son fundamentalmente importancia en la presencia y magnitud de los daños antes descritos.

El enfriamiento debe ser un proceso lento, al contrario de la congelación que debe ser lo más rápida posible.

AGENTES PROTECTORES

Yema de Huevo: el rol protector de la yema de huevo fue primeramente demostrado por Phillips (1930). Watson y Martin (1975) determinaron que los elementos protectores son lipoproteínas de bajo peso molecular, potentes a baja concentración y que actuarían directamente a nivel de la membrana celular adhiriéndose a ella y protegiéndola durante la fase de enfriamiento.

Leche: Salisbury Wandermark (1964) citan a Kolliker como el primer investigador que utilizó leche para diluir semen ovino. Las lecitinas y proteínas de baja densidad que la leche contiene constituyen los agentes protectores espermáticos. Su mecanismo de acción es semejante al de la yema de huevo.

En la actualidad se utiliza la leche descremada como diluyente en la etapa de enfriamiento seminal.

CRIOPROTECTORES: según Salamon, Wilmot y Polge (1973) los crioprotectores se dividen en:

1) Penetrantes: por ejemplo el glicerol: su efecto protector está basado en la capacidad de unirse a las estructura molecular del agua, reforzándola (propiedad coligativa) provocando un descenso del punto de congelación y aumentando la viscosidad. Esto retarda la formación de hielo y la rápida concentración de sales. Por consiguiente el glicerol permite la formación limitada de hielo, evita su crecimiento y reduce la concentración de sales al mantener una parte del agua sin congelar; también ayuda a la dilución de eletrólitos.

Cuando se incorpora glicerina a un medio isotónico este se vuelve hipertónico y la célula libera agua al medio extracelular para equilibrar las diferencias de presiones. Como el glicerol penetra en el citoplasma celular, la célula incorpora agua de acuerdo a la concentración de glicerol penetra en el citoplasma celular. Este proceso biofísico es dependiente del tiempo y se denomina "equilibración".

La glicerina modifica también la estructura de los cristales de hielo que se forman al congelarse el agua, disminuyendo la posibilidad de un trauma mecánico por punción de la membrana.

El glicerol presenta la característica que su grado de penetración en la célula varía con la temperatura, haciéndose casi nula a 0°C. Variando la temperatura del medio al que se agrega el glicerol se logra disminuir su toxicidad.

2) No penetrantes: dextrin, peptona, metilcelulosa (Leiacal M 20), polyvimilpyrrolidona, ácido etil diamino tetra acético dimetil

sulfóxido (DMSO) y lactosa, entre otros.

RESULTADO OBTENIDOS CON DIFERENTES DILUYENTES

Watson y Martin (1975) utilizaron como variable la yema de huevo, la tasa de congelación y el glicerol en diferentes concentraciones agregado a 30°C y a 4°C. Encontraron que la presencia de la yema de huevo mejora la motilidad espermática luego de la congelación. La supervivencia de los espermatozoides a la congelación – descongelación fue mejorada con la presencia del glicerol, sin que existan diferencias significativas entre el 2,5 y 7,5 de glicerol. Además hallaron que la motilidad mejora con una tasa de congelación de 24°C por minuto. En consecuencia es posible reducir el nivel de glicerol de 7,5 a 2,5% y aun más, cuando interactúa con la yema de huevo que disminuye la toxicidad del glicerol.

Colas (1975), estudió el efecto de la temperatura, el momento de adición del glicerol, diferentes temperaturas de congelación, el porcentaje de glicerol a agregar al medio y el tiempo de equilibración sobre la motilidad espermática.

Encontró que la motilidad es mayor cuando el glicerol se agrega a 4°C y que mejora con una congelación rápida a -75°C y cuando el tiempo de equilibración es mayor. El nivel óptimo de glicerol en el carnero fue del 4 %.

Salamon, Wilmut y Poge (1973) probaron azúcares, glicerol,

polímeros de bajo peso molecular y agentes no penetrantes como crioprotectores evaluándolos a través del porcentaje de motilidad espermática a la descongelación. Con azúcares la mejor motilidad espermática se alcanzó con la glucosa. Los polímeros de bajo peso molecular dieron una buena protección al espermatozoide durante la congelación, aún más cuando se le agregó glicerol al 4,5%; los agentes no penetrantes dieron una baja protección al espermatozoide durante el proceso de congelación – descongelación.

Fiser (1982) comparó dos diluyentes hipertónicos frente a dos isotónicos. Fueron probados mediante una prueba in vitro – el test de termoresistencia – a los 60 minutos de la descongelación, evaluando la tasa de motilidad. El autor encontró que la motilidad. El autor encontró que la motilidad espermática fue significativamente incrementada con soluciones hipertónicas.

Según Williams y Harris (citado por Fiser, 1982) el dextran es tan activo como los azúcares. El mismo se distribuiría dentro de los lípidos de la membrana celular proveyendo así una protección frente al shock de frío y en consecuencia podría sustituir a la yema de huevo.

Fiser, Ainsworth y Fairful (1987), desarrollaron un nuevo diluyente para aprovechar la acción penetrante del glicerol en el espermatozoide y un crioprotector no penetrante como dextran – azúcar. Los autores además probaron tres formas de congelación: a) luego de la etapa de equilibración se utilizó un aparato programable para llegar hasta -100°C (curva descendente de frío de 20°C por minuto) y pasando posteriormente el semen a nitrógeno líquido; b)

luego de la equilibración las pajuelas fueron congeladas sobre un block de hielo seco; c) se diluyó el semen a 16°C con el nuevo diluyente, a partir de esa temperatura se enfrió más lentamente (0,2°C/minuto) hasta los 5°C y posteriormente se continuó como en (a). No encontraron diferencias significativas entre los tres métodos a la descongelación ni entre los porcentajes de preñez que fueron 72,7%, 66,7% y 80% respectivamente.

MÉTODOS DE EVALUACION DE SEMEN

El único test capaz de predecir con un 100% de eficacia el grado de fertilidad de un reproductor es el porcentaje de preñez resultante de sus servicios naturales o artificiales (Durán del Campo,1980).

Otro método, más práctico pero no tan seguro es la evaluación seminal. Son varias las pruebas para determinar la calidad seminal; entre ellas se encuentran las siguientes:

I- CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Los métodos para determinar la concentración espermática son:

1) **Recuento hemocitométrico microscópico** del número de células que se encuentran en un volumen determinado: una muestra de semen es diluido en una proporción constante, conocida, y se efectúa el recuento de los espermatozoides con un cámara cuentaglóbulos (De Thoma o de Neubauer).

2) **Recuento nefelométrico:** teniendo en cuenta la capacidad de absorción de la luz del esperma diluido en proporción fija, se compara su densidad óptica con la de una muestra de esperma de concentración conocida.

3) **Por comparación de la densidad óptica** del semen diluido en proporción determinada con la del sulfato bórico u otros prototipos de densidad conocida.

4) **Por determinación del volumen celular** calibrado mediante recuento directo.

II- MOTILIDAD MASAL

Comprende el movimiento en masa que realizan los espermatozoides de acuerdo a la concentración y vitalidad de las células espermáticas. Las ondas se evalúan según el ancho de la base, la altura de la onda, la densidad (grado de oscurecimiento) y la velocidad con que se forman y desaparecen las ondas (Salisbury y Vandermark, 1964; Colas, 1975; Linford y col, 1976; Groove, 1977; Evans y Maxwell, 1987).

De acuerdo a la escala subjetiva propuesta por Smith (1967) que varía entre 0 y 5, para que un eyaculado sea considerado congelable sus valores en la misma deben oscilar entre 4 – 5.

IIII – MOVILIDAD ESPERMÁTICA INDIVIDUAL

Por tipo de movilidad se entiende la forma de desplazamiento del espermatozoide pudiendo ser: - progresiva, cuando se dirige rotando sobre su eje medial hacia delante; - de retroceso cuando por anomalías de la cola espermática se dirige hacia atrás; - en círculo cuando gira sin avanzar y - vibratorio cuando está animado de simples movimientos de

esa forma. Su estimación es subjetiva (Buchneer y Willett, 1954; Cola, 1975; Duran del Campo, 1980; Fiser y col, 1987; Palma, 1988).

Un eyaculado, para ser congelable, debe poseer una motilidad progresiva no inferior al 70%.

IV- MEDIDAS OBJETIVAS DE MOTILIDAD

Jask y col. (1989) describieron un procedimiento simple para determinar la motilidad espermática con medidas objetivas; lo realizaron en equinos y la medición se realizó utilizando un espectrofotómetro .

- **Motilidad espermática con filtro de Sephadex:** el método de filtración de Sephadex es una prueba objetiva para conocer la vitalidad espermática. Determina el número exacto de espermatozoides vivos y muertos de una muestra. La técnica consiste en el pasaje de espermatozoides por una columna de Saphadex. Solamente los espermatozoides con motilidad pasan a través de la columna. Las células son colectadas, contadas y comparadas con la concentración de la muestra original (Graham y col 1978). La relación entre el conteo de células espermáticas vivas utilizando filtro de Sephadex y la fertilidad es de $R= 0,510$ (Graham y col., 1978).
- **Reducción del azul de metileno:** su principio está fundado en la actividad catalizadora desempeñada por las enzimas deshidrogenasas; éstas se encuentran en el citoplasma de los espermatozoides y otras células vivas que en determinados momentos provocan una liberación de hidrógeno.

El índice de la actividad de deshidrogenación celular, deberá variar en función de la cantidad y actividad celular y es precisamente determinado midiendo la cantidad de hidrógeno liberado. Este puede ser medido agregando azul de metileno en cantidades constantes ya que esta sustancia en presencia de hidrógeno se transforma en leuco azul de metileno, tornándose incolora. Cuanto mayor sea el número de espermatozoides menor será el tiempo en que vuelve incoloro (Bulkver y col 1954, Salisbury y Vandermarck, 1964). La prueba no es exacta porque la liberación de hidrógeno ni es patrimonio exclusivo de los espermatozoides sino de toda célula viva (Durán del Campo, 1980).

También se puede utilizar RESARZURINA en lugar de azul de metileno. El color varía de púrpura a blanco.

- Consumo de oxígeno (actividad metabólica): Salisbury y Vandermarck (1964) citan a Walton y Edwards (1938) como los primeros en proponer un método de medición de la actividad metabólica como exponente de la capacidad fecundante potencial de los espermatozoides y utilizaron para ello el consumo de oxígeno de una muestra de esperma. La técnica consiste en la determinación manométrica del oxígeno consumido, utilizando un sistema cerrado en el cual el dióxido de carbono producido es absorbido por un álcali, luego se pesa el álcali y por diferencia el dióxido de carbono producido. Este método tiene la limitante que la prueba debe realizarse en un ambiente desprovisto de dióxido de carbono. Se ha

demostrado además que los procesos metabólicos de los espermatozoides bovinos se desenvuelven mejor en presencia del dióxido de carbono que en su ausencia.

- Índice de fructólisis: el índice de fructólisis ha sido definido como la cantidad de fructuosa expresada en mm utilizada durante una hora a 37°C por 10^9 espermatozoides. El índice de fructólisis bovino se sitúa entre 1,4 y 2 y tiene una correlación significativa tanto con la concentración como con la motilidad espermática (Salisbury y Vandermarck, 1964; Derivaux, 1976).

- Contenido de Proacrosina: la acrosina es una enzima proteolítica que se localiza dentro del acrosoma y debe activarse antes de salir del acrosoma para cumplir su función lítica. La retención de la enzima (pro-acrosina) ha sido utilizada para determinar la funcionalidad potencial de los espermatozoides. Las medidas de acrosinas se hacen dificultosas porque: - a) la enzima se encuentra en forma de precursor y se debe activar en forma uniforme; - b) los espermatozoides contienen un inhibidor de la enzima; c) esta enzima tiende a degradarse por auto-proteólisis. La actividad se expresa en unidades internacionales donde 1 I.U. es igual a la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto de 10^9 espermatozoides bajo condiciones definidas (Pace y Sullivan, 1978 ; Pace y col, 1981; Garner, 1984).

- Retención de la actividad de la G.O.T.: la enzima transaminasa glutámica oxalacética se encuentra localizada en la porción intermedia de los espermatozoides, está relacionada con el

metabolismo oxidativo y por consiguiente con la motilidad espermática (Pace y col, 1981).

V- MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD ACROSÓMICA

La importancia de la integridad acrosómica en los criterios de evaluación seminal está destacada en los trabajos que demostraron que la integridad del capuchón acrosómico se relaciona con la capacidad fertilizante con una correlación de $r= 0,81$ (Saacke y White, 1972).

Números incrementados de espermatozoides con aberraciones morfológicas son indicadores de baja capacidad fecundante. En consecuencia, la morfología espermática fue considerada por varios autores como uno de los criterios simples de evaluación más importantes para predecir la capacidad fecundante de un animal (Salisbury y col, 1964; Alberio, 1976; Durán del Campo, 1980; Evans y Maxwell, 1987).

Salisbury y Mercier (1945), buscando qué número de células es necesario observar para determinar con precisión el porcentaje de malformaciones, encontraron que se progresa muy poco en la precisión de la información cuando se cuenta con más de 100 células por frotis.

La morfología acrosómica: puede ser evaluada mediante varios métodos:

- **Colorante supravital:**

Se emplea originalmente para determinar el número de espermatozoides vivos y muertos de una muestra seminal. Se basa en el principio que las células espermáticas muertas o en proceso de degradación celular (muerte) poseen sus membranas permeables a los colorantes. El contraste entre el acrosoma con la cabeza del espermatozoide permite observar al primer.

- **Coloración de eosina – nigrosina:**

Consta de dos soluciones colorantes:

a) Solución de eosina al 2%

0,2 g eosina

0,3 g citrato de sodio deshidratado

10 ml agua destilada

b) Solución de nigrosina al 10%

1,0g nigrosina

10 ml agua destilada

Se realiza un frotis con una gota de semen, una de la solución (a) y otra de (b) mezcladas sobre un portaobjetos. Es necesario tener cuidado con la humedad ya que los colorantes son higroscópicos y el agua presente puede destruir los espermatozoides.

El colorante de eosina – nigrosina también se utiliza de rutina

para observación de morfología espermática.

Wishart y Palmer (1986), Evans y Maxwell (1987) utilizaron una tinción supravital para detectar malformaciones espermáticas.

Un semen con más de 30% de espermatozoides coloreados no es congelable (Palma, 1988) considerando las condiciones mínimas establecidas para la conservación por medio de la congelación.

- **Tinta China:**

Esta es una tinción útil para la observación de morfología acrosómica.

- **Tinción de Giemsa:**

Esta tinción se utiliza para determinar el daño acrosómico (Watson y Martin, 1972, 1975).

- **Contraste de fase:**

Un sistema alternativo para detectar malformaciones espermáticas es el microscopio de contraste de fase, el cual tiene las ventajas que no necesita realizar una tinción para la observación (Aalseth y Saacke, 1987, entre otros).

- **Microscopio electrónico:**

Con ayuda de la microscopía electrónica se pueden determinar daños morfológicos del espermatozoide.

Healey (1969) lo utilizó para observar el efecto de la congelación

sobre la ultraestructura de los espermatozoides de varios animales domésticos.

VI – FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA Y LAS ORGANELAS

Garner (1984) considera que con estas pruebas es posible medir la funcionalidad de la membrana de las células espermáticas. Se basan en pruebas citoinmunogenéticas de fluorescencia. Los derivados del diacetato de fluoroceina se mostraron útiles para medir aspectos funcionales de la membrana y organelas espermáticas. Estas pruebas no han podido ser útiles para determinar la capacidad fecundante de los espermatozoides.

VII – PRUEBAS BIOLÓGICAS DE CALIDAD SEMINAL

Estas medidas biológicas incluyen las llamadas pruebas de "penetración espermática". Se basa en la penetración espermática de la zona pelúcida de un ovocito de la misma especie o de un ovocito de hamster sin zona pelúcida. Lo que confiere especificidad a un ovocito es la zona pelúcida (compuesta por glicoproteínas). Si se extrae la membrana pelúcida del ovocito de hamster, por ejemplo, puede ser penetrado por un espermatozoide de otra especie y observarse el contenido acromosómico. Esta prueba no provee informaciones sobre otros factores requeridos para la penetración de la zona pelúcida que hacen a la capacidad fecundante del espermatozoide.

Eaglesom y Miller (1989) sugieren que el test de penetración de

ovocito de hamster no puede ser usado con semen fresco para predecir niveles de capacidad fecundante de semen congelado. La tasa subjetiva de motilidad masal espermática tampoco se relaciona con la habilidad de los espermatozoide de penetrar in vitro los ovocitos de hamster.

VIII- PRUEBA DE TERMORESISTENCIA

A través de este test se someten los espermatozoides a una temperatura similar a la uterina que estimula el metabolismo celular aumentando la motilidad.

El interés de este test se basa en la posibilidad de que la duración de la motilidad (viabilidad) de los espermatozoides, mantenga la relación directa con el grado de fertilidad. Teóricamente al menos, se puede pensar que aquellos espermatozoides capaces de sobrevivir más tiempo son inicialmente los más fértiles. El método es práctico y de uso corriente.

Lightfoot y Salamon (1969) lo utilizaron incubando a 37°C y observando a las 0, 2 y 4 horas. Jondet y Rabadenx (1976) incubaron a 38°C durante 5 horas, con observaciones a cada hora.

Aaltsh y Saacke (1987) utilizaron el test de termoresistencia a las 0, 2 y 4 horas post – descongelación.

Shanon y Curson (1987) utilizaron el test de termoresistencia para medir el tiempo que tardaban los espermatozoides en perder la

motilidad y luego compararon esos tiempos.

Otros autores que emplearon el test de termoresistencia para evaluar sus trabajos fueron: Colas, (1975); Colas y Guerin, (1981); Fiser, Ainswort y Fairfull (1982); Salem y col (1988), entre otros.

IX- ANÁLISIS MULTIPLE DE CALIDAD SEMINAL

Las pruebas simples de la calidad seminal son de poco valor para deteminar la calidad de fertilizante de los espermatozoides debido a que son medidas físicas o químicas individuales de la calidad (Garner, 1984). Bucker y col. (1954) relacionaron la fertilidad con varias pruebas de calidad seminal y encontraron un $R= 0,74$ cuando correlacionaron los test de calidad con la tasa de no retorno a los 60 – 90 días como indicadores de fertilidad entre toros mientras que obtuvieron un $R= 0,87$ cuando compararon los eyaculados entre sí y con la fertilidad obtenida.

Hirao (1975) llevó a cabo un Análisis de regresión múltiple de la calidad seminal a través de distintas variables: motilidad espermática progresiva, sólidos totales, nitrógeno total, glicerolfosforilcolina, ácido cítrico, fructuosa y morfológica; el coeficiente de correlación entre la combinación de variables y la preñez evaluada a través de la tasa de no retorno fue de $R= 0,87$.

Este valor sostiene el concepto que la morfología y el número de espermatozoide con motilidad progresiva serían los indicadores para desarrollar criterios de Análisis múltiples que puedan predecir el potencial fecundante de los espermatozoides.

Linfor y col. (1976) estudiaron la relación entre los métodos de evaluación de semen y la fertilidad en el toro, para esto realizaron dos experimentos en los cuales la calidad del semen fue comparada por medio de diferentes pruebas in vitro. Los resultados revelan las limitantes de los test de laboratorio utilizados para predecir la capacidad fecundante de las muestras de semen.

PACE y col. (1981) evaluaron la calidad seminal por medio de la motilidad progresiva, porcentaje de acrosomas intactos, actividad de la acrosina, actividad de la G.O.T., capacidad fecundante del espermatozoide de atravesar un filtro de SHEPADEX. El objetivo del trabajo fue: a) determinar cómo la capacidad fecundante es afectada por variaciones de la temperatura de descongelación; b) obtener estimadores de la relación entre pruebas de laboratorio in vitro para determinar calidad espermática y fertilidad; c) determinar el número de espermatozoides viables requeridos en la dosis inseminante para nivel óptimo de fertilidad.

Los espermatozoides descongelados a 37°C fueron superiores significativamente a los descongelados a otras temperaturas.

Un Análisis de regresión fue utilizado para analizar la fertilidad por que el número de espermatozoides viables fue diferente para cada proceso de descongelación. La media de tasa de no retorno fue de 66.9 +/- 2.5%, los coeficientes de correlación entre tasa de no retorno y número viable de espermatozoide a la descongelación por motilidad progresiva fue 0.42, total de acrosomas intactos 0.43, acrosin 0.36,

G.T.O. filtrado 0.39.

El estudio no comparó igual número de espermatozoides viables por toro.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el campo experimental N°8 de la Estación Experimental Agropecuaria de Balcarce (37°45' latitud sur, 58°18' longitud. oeste).

Obtención de semen:

Fueron utilizados 10 carneros Corriedale adultos cuyas edades oscilaron entre los 30 y 54 meses, clínicamente aptos para la reproducción.

Con el objeto de entrar a los animales en la rutina de trabajo y contar además con una frecuencia de extracción de semen (Amir y col, 1986), se extrajo semen tres veces por semana durante 35 días en los meses de enero y febrero. La extracción de semen fue realizada con una vagina artificial; esta se compone de un tubo rígido de goma de 20 cm de largo con una válvula para colocar agua caliente, una camisa interna de latex, un cono intermediario de latex y un tubo colector graduado de semen, todo esto recubierto por una vaina o funda de cuero (Bitsch, 1972; Durán del Campo, 1980; Grove, 1977).

Evaluación del semen antes de la congelación:

Para determinar si un eyaculado cumplía con los requisitos mínimos para ser congelables se realizaron las siguientes evaluaciones:

- Macroscópicas:
 - Volumen
 - Presencia de cuerpos extraños

- Microscópicas:
 - Motilidad masal microscópica
 - Concentración espermática (con ayuda de un espectrofotocolorímetro)
 - Motilidad progresiva
 - Morfología de los espermatozoides coloreados con eosina – nigrosina

Solamente se congelaron los eyaculados que cumplieron con los siguientes requisitos: motilidad masal superior a 4 según La escala propuesta por Smith (1967); motilidad progresiva rectilínea no inferior al 70% y alteraciones morfológicas totales no superiores al 20% (Tekin, 1982; Palma, 1988).

- Congelación:

Para la congelación se siguió el procedimiento descrito por Palma (1988) que es una combinación del método recomendado para congelar con pajuelas Cassaur y el utilizado para descongelar con pajuelas Minitubs de la Clínica de Andrología de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria de Hannover (República Federal Alemana).

Se basa en diluir el semen con un diluyente glicerinado cuyos componentes son:

Solución base*	76%
Yema de huevo	20%
Glicerol	4%

*tris (hidroximetil aminometano)	38,28gr
D fructuosa	12,50gr
Ac. Cítrico	17,80gr
Agua bidestilada	920,00gr

El eyaculado fue diluido para obtener una dosis de 40×10^6 espermatozoides. Posteriormente se llenaron las pajuelas de 0.25 cc a temperatura de laboratorio, ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) para luego pasar a la etapa de equilibración en heladera a 5°C durante 2 horas. La congelación se realizó en vapores de nitrógeno líquido a 4 cm por encima del nivel del mismo concluyendo con la inmersión de las pajuelas en el nitrógeno líquido.

CUADRO N°1: Evaluación del semen previo a la congelación

N. Car	N° eyaculado	M. Masal	Concent. $\times 10^6$	MI	Motil. Prog.
82	3	4,7	4.361	1,0	85
87	2	4,8	2.970	1,1	85
89	2	4,9	3.556	1,3	80
86	3	4,7	2.861	0,8	90
88	2	4,7	3.600	0,8	80
84	1	4,8	4.400	1,4	80

Evaluación in vitro del semen descongelado:

A fin de disponer de semen de diferentes calidades, de acuerdo a la evaluación in vitro, se congeló de cada animal un pequeño número de porciones (5 pajuelas) con una dosis de 40×10^6 espermatozoides 2 veces por semana.

Esto se realizó con el propósito de caracterizar los valores de motilidad progresiva rectilínea al momento de la descongelación y a las 4 horas post -descongelación junto con la morfología seminal (Neves, 1980). La descongelación se practicó a 37°C durante 10 segundos.

En base a esta metodología se seleccionaron animales que respondieran a los requisitos del presente trabajo.

Durante el mes de marzo (plena época reproductiva) fueron congelados los eyaculados que cumplieron con los requisitos previamente descritos, de los animales elegidos.

Con la excepción del carnero N°86 que en una oportunidad tuvo un 25% de motilidad progresiva rectilínea a la descongelación, todos los otros eyaculados congelados tuvieron un porcentaje de M.P.R. que varió entre 35 y 45 % al momento de la descongelación.

Para determinar el tamaño de muestra a descongelar se utilizó la siguiente ecuación:

$$N = T^2 \cdot S / D^2 \quad (\text{Steel y Torrie, 1980})$$

donde T^2 es una T de tabla de Student con infinitos grados de libertad, S es el desvío standard de una experiencia previa y D^2 es el error

$$\frac{3,84 * 0,27}{0,25} = 4,1$$

El semen descongelado fue evaluado por medio de un test de termoresistencia (Colas, 1975; Linford y col, 1976; Evans y Maxwell, 1987).

Se evaluó la motilidad progresiva rectilínea al momento de la descongelación y posteriormente a las 2 y a las 4 horas. Fueron determinadas también las alteraciones morfológicas del acrosoma con tinción de eosina - nigrosina al momento de la descongelación y luego de pasadas 4 horas.

CUADRO N°2: Esquema del test de termoresistencia

	0hs.	2hs.	4hs.
M.P.R. Evaluación	X	X	X
Morfológica	X		X

A partir de los datos de motilidad progresiva rectilínea a las 4 horas del test de termoresistencia se formaron 3 grupos.

CUADRO N°3

A =	>20% M.P.R.
B =	7 - 10% M.P.R.
C =	1%M.P.R.

Con las 30 pajuelas restantes de cada eyaculado se formó un pool de cada grupo: A, B y C.

Método de evaluación in vivo:

Las ovejas para realizar el ensayo fueron seleccionadas de una población de 400 animales adultos (más de 2 años de edad) de raza Corredale, clínicamente aptas para la reproducción. Sobre ellas se determinó el porcentaje de preñez por medio de la tasa de no retorno. A todos los animales que no retornaron al celo durante 21 días posteriores a la inseminación se los consideró preñados.

Para poder determinar el número de animales a inseminar por medio de laparoscopia sobre celo natural, se utilizó la fórmula de Cochran (1959) para determinar el tamaño de muestra:

$$N = \frac{T^2 \cdot P \cdot Q}{D^2}$$

T^2 = Grado de confianza

p = porcentaje de preñez estimado

q = porcentaje de vacías estimado

d^2 = error admisible

Se siguió a O' Rourke (1986) el cual indica que si la media esperada se encuentra fuera del rango de 0,2 – 0,8 debería tener un mínimo de 40 grados de libertad entonces:

$$N = \frac{3.84 \cdot 50 \cdot 50}{50 \cdot 50}$$

$$100$$

$$100$$

$$N = 42.68 \text{ ovejas}$$

Este número de animales cumplía con el requisito de O' Rourke (1986) que indica que un ensayo debe tener 40 grados de libertad como mínimo. Al ser la oveja inseminada la unidad experimental se cumple con el requisito.

Se inseminaron por laparoscopia el siguiente número de ovejas en celo natural:

SEMEN	NºOVEJAS
A	47
B	52
C	48

Para la detección de ovejas en celo natural se utilizaron carneros vasectomizados con arnés marcador. Las ovejas en celo fueron separadas cada 12 horas (a las 7 y 19 horas), la inseminación intrauterina por medio de laparoscopia se efectuó 13 horas después del aparte.

Las ovejas fueron inseminadas intrauterinamente con la ayuda de un laparoscopio, técnica descrita por Killen y Cafery (1982), posteriormente utilizada por Maxwell y Hewitt (1986) y Azzarini (1987), entre otros.

Los animales apartados para la inseminación fueron individualizados y divididos en 3 grupos en forma aleatoria de acuerdo a las 3 categorías de semen congelado.

La descongelación de las pajuelas se realizó a 37°C durante 10 segundos y no transcurrieron más de 5 minutos entre la descongelación y su descarga en el cuerno uterino.

Cada animal recibió una dosis de $40 * 10^6$ espermatozoides totales, la mitad de la dosis en cada cuerno uterino.

Teniendo en cuenta la tasa de viabilidad después de la descongelación el número de espermatozoides vivos fue de $20 * 10^6$ espermatozoides. Esto implica $10 * 10^6$ espermatozoides viables por cuerno uterino.

Análisis Estadístico:

Para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos de semen (A, B, C) se utilizó el test de comparaciones múltiples de Duncan (Steel y Torrie, 1980).

Los datos de preñez fueron analizados por el procedimiento catmod del paquete S.A.S.

El modelo utilizado fue:

$$Y_{ij} = U + T_i + E_j$$

Y = Variable respuesta

U = media general

T_i = efecto del tratamiento

E_j = error

RESULTADOS

Todos los eyaculados congelados tuvieron una motilidad masal superior a 4 según escala de Smith (1967).

La motilidad progresiva rectilínea no fue inferior al 80% y las alteraciones morfológicas totales no superaron el 10% siendo solo del 7% las alteraciones acrosómicas previas al proceso de congelación – descongelación. De acuerdo con los resultados se formaron 3 grupos con los eyaculados que respondían al propósito del trabajo.

Los porcentajes medios de motilidad progresiva rectilínea a la descongelación evaluados por el test de termoresistencia a las 0, 2 y 4 horas post – descongelación a 37°C durante 10 segundos fueron.

CUADRO N°4: Porcentaje de M.P.R. de los 3 grupos durante el test de termoresistencia a 37°C

Hs	A	B	C
0	44,5	37,5	39,5
2	35,0	23,0	13,5
4	22,5	7,87	0,9

Como se observa en el cuadro N° 4 no hay diferencias al momento de la descongelación mientras a las 4 hs post descongelación el semen presenta marcadas diferencias

Los grupos de semen se formaron teniendo en cuenta la diferencia entre ellos a la última observación del test de termoresistencia (4 horas).

Se compararon los 3 grupos de semen formados con la ayuda del test de comparaciones de media de Duncan. Se demostró que son diferentes estadísticamente, como se observa en siguiente cuadro:

CUADRO N°5

SEMEN	MEDIA
A	22,5 h
B	8 m
C	0,9 k

Letras distintas indican diferencias significativas con una probabilidad del 5%.

A posteriori de la inseminación (30 días) se realizó la determinación de preñez por medio de la tasa de no retorno observándose que el número de ovejas preñadas variaba entre 29 a 31. Esto puede observarse en el cuadro N° 6 en el que también se puede apreciar el número total de ovejas inseminadas por calidad seminal, destacándose que se cumple lo propuesto en materiales y métodos (42 animales por grupo)

CUADRO N°6: Cuadro de animales preñados y retorno

Semen	A	B	C
Preñadas	31	31	29
Retorno	16	21	19
TOTAL	47	52	48

Los porcentajes de preñez y retorno se observan en el siguiente cuadro:

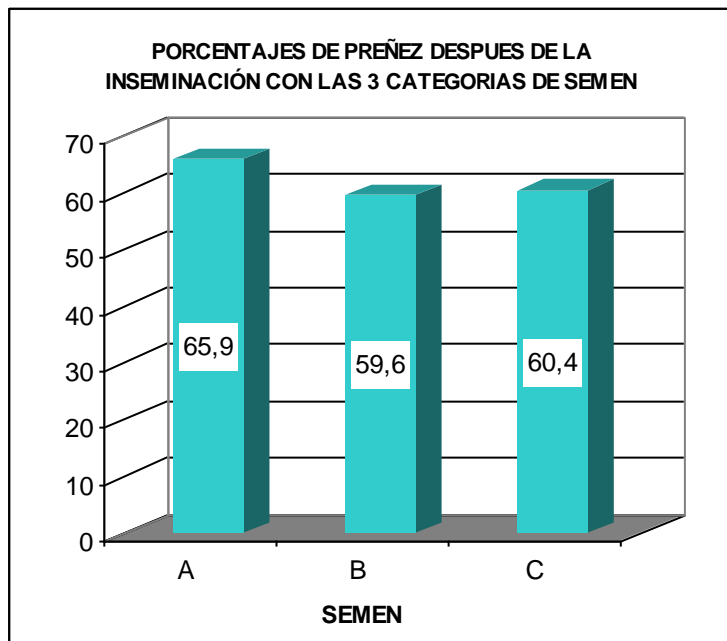
CUADRO N°7: Porcentaje de preñez y retorno

SEMEN	A	B	C
PREÑEZ	65,95	59,60	60,41
RETORNO	34,04	40,38	38,00

Del cuadro N° 7 se desprende que la mayor diferencia en los porcentajes de preñez es de 6,35 entre las calidades A y B de semen

En la figura N° 1 se observa los porcentajes de preñez logrados por categoría de semen

Fig. N° 1



Los datos de no retorno fueron analizados con el procedimiento catmod del paquete estadístico S.A.S. con el siguiente resultado:

Cuadro resumen de resultados

Fuente de Variación	Grados Libertad	Chi Cuadrado	Prob.
Intercepto	1	8,30	0,004
Semen	2	0,49	0,7839

El resultado expresa que hay un 78,39 % de probabilidades que los porcentajes de preñez sean iguales; no hay diferencias significativas entre los porcentajes de preñez obtenidos con los tres tipos de semen evaluados por el test de termoresistencia a las 4 horas post-descongelación.

DISCUSIÓN

De acuerdo con la hipótesis enunciada, se comprobó que tres calidades de semen congelado, sin diferencias estadísticas al momento de la descongelación y que presentaban diferencias significativas en la motilidad progresiva rectilínea 4 horas después de la incubación a 37°C, no presentaron diferencias en los porcentajes de preñez obtenidos.

Si se compara el porcentaje de preñez logrado con semen congelado e inseminado por medio de laparoscopia (66%, 60% y 60%) con los obtenidos por otros autores, se observa que no existen grandes diferencias ya que la mayoría obtienen valores que varían en entre 47% y 76% (Lightfoot y Salamon, 1970; Colas, 1975; Maxwell, 1986; Azzarini y Valledor, 1987, 1988, etc.) con la excepción de Andersen, Aambal, y Fougner (1973) que alcanzaron un 89% de preñez con semen congelado pero no por laparoscopia sino atravesando el cérvix. Es de destacar que esta técnica requiere gran habilidad del operador y además ofrece baja repetitividad como lo demostraron Fukui y Roberts en el año 1976.

El punto en el que si se encuentran grandes diferencias es en las dosis inseminantes utilizadas y en el modo de sincronizar el celo.

En este ensayo se utilizó una dosis inseminante de 20×10^6 espermatozoides como una dosis total, la cual es considerada una dosis inseminante pequeña. El objetivo de utilizar esta dosis fue lograr que la preñez alcanzada sea un resultado de la calidad seminal más que un resultado de la dosis espermática utilizada. Así podemos observar

como Colas (1975) utilizó una dosis de 9×10^6 espermatozoides móviles a la descongelación con un 48% de motilidad a la descongelación. Mientras que Azzarini y Valledor (1987) y Maxwell (1986, 1986a) utilizaron dosis que varían entre 20 y 25×10^6 espermatozoides móviles post descongelación; por otro lado Lightfoot y Salamon (1970a), Andersen, Aamadal y Fougner (1973), Haresing y Read (1986) usaron dosis inseminantes altas variando entre 160×10^6 a 4×10^8 . Obteniendo los resultados mencionados con anterioridad.

Otro punto a tener en cuenta en el análisis es el momento de inseminación y la forma de sincronizar el celo. La inseminación se realizó 12 horas después de detectado el celo natural, basándonos en trabajos de García Vinet (1990) según el cual ese es el momento óptimo para la inseminación. En el presente trabajo esto se realizó de este modo para facilitar la manifestación de la calidad seminal.

La mayoría de los trabajos toman en cuenta si fueron realizados sobre celo natural o sincronizado, por lo general con progestágenos, se considera que existe un 10% más de preñez a favor del celo natural.

Tanto Maxwell (1986b) como Hunton (1987) encontraron diferencias entre los carneros que no dan información sobre las pruebas in vitro a que fue sometido el semen para saber si la diferencia entre ellos es en el momento de la descongelación ó en el test de termoresistencia. Esta información aportaría una idea de la congelabilidad del semen de esos carneros y podríamos establecer comparaciones entre este y otros trabajos. Por otro lado Neves (1980) encontró variaciones individuales de los carneros en la calidad del

semen a la descongelación.

Evans y Maxwell (1987) recomiendan sólo utilizar para inseminar con semen congelado a aquellos eyaculados que posean entre 30 y 40% de espermatozoides móviles a las 4 horas de incubación (test de termoresistencia). Esto no coincide con los resultados alcanzados por este trabajo ya que con valores de 20, 7, 0 y 9% de motilidad progresiva a las 4 horas de incubación, se consiguieron porcentajes de preñez entre el 60 al 65%. Por otro lado Colas (1979) utilizó un semen de 20% de motilidad a las 3 horas de incubación y logró un 50% de preñez. Este resultado es semejante al alcanzado por el semen de calidad A utilizado en este trabajo.

En nuestro caso el test de termoresistencia fue inadecuado para predecir la fertilidad de los espermatozoides de ovinos ya que un semen que presentaba un 0,9% de motilidad progresiva rectilínea a las 4 horas de incubación no presentó diferencias significativas a la preñez al compararlo con otro que poseía un 20% al mismo tiempo.

Esto se podría explicar porque el semen es colocado en los cuernos uterinos a los pocos minutos después de la descongelación. Los resultados indicaron que las condiciones del medio uterino son diferentes a las de una incubación in vitro. Es de destacar que el semen utilizado tenía un 40% de motilidad progresiva al momento de descongelación, lo que se considera un semen de buena calidad. Esto significa que la primera evaluación a la descongelación fue válida para predecir los valores de preñez esperables con esta técnica.

Estudios realizados por otros autores en la inseminación artificial sugieren la importancia de la utilización de pruebas combinadas. Sería interesante realizar más estudios a fin de determinar si esas combinaciones propuestas son aplicables a la inseminación artificial por medio de laparoscopia (Pace y col. 1981; Linford y col. 1975; Saacke y White 1972; etc.).

En el presente trabajo no se intentó probar una combinación de pruebas sino correlacionar el test de termoresistencia con la fertilidad porque es una técnica muy difundida por su bajo costo y facilidad de realización. También surge del trabajo que un semen que no es satisfactorio al test de termoresistencia debería volverse a evaluar antes de descartar todo el eyaculado.

Deberían realizarse estudios in vitro particularmente a la 0hs. de descongelación a fin de caracterizar la importancia de valores de motilidad progresiva rectilínea como factor de predicción de la tasa de preñez y de esa forma establecer nuevos criterios para el trabajo para el empleo racional de esta técnica.

Una combinación de pruebas que podría utilizarse para predecir la fertilidad de un semen es el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea al momento de la descongelación así como el porcentaje de malformaciones.

CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo confirmaron la hipótesis y objetivos planteados es decir la capacidad fecundante de semen congelado a diferentes calidades 4 hs post descongelación alcanzaron porcentajes de preñez sin diferencias estadísticas.

Los resultados obtenidos en este ensayo indican la necesidad de continuar con estudios de calidad seminal tanto al momento de la descongelación como a las 4hs. posteriores a la descongelación con la finalidad de determinar aplicaciones prácticas para los centros de inseminación artificial.

BIBLIOGRAFÍA

- AALSETH, E. P. SAACKE, R.G. (1987) Alteration of the anterior acrosome of motile bovine spermatozoa by fructose and hydrogen ion concentration. *J. Reprod. Fert.* 81: 625- 634.
- ALBERIO, R. (1979) Avances en conservación de semen INTA, Bol Tec. N°80: 1-20
- ANDERSEN, VON F. AAMDAL, J. FOUIGNER, J.A. (1973) Intrauterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep. *Zuchthyg.* 8: 113 -118
- AZZARINI, M. VALLEDOR, F. (1987) Inseminación intrauterina con semen congelado en ovejas. *Ovinos y lanas* 16: 7-16
- AZZARINI, M. VALLEDOR, F. (1988) Inseminación intrauterina o cervical con semen congelado o fresco en ovejas en celo natural. *Prod. Ovina* 1: 1-8
- BUCKNER, P. J. WILLETT, E. L. (1954) Laboratory tests singly and in combination for evaluating fertility of semen of bull. *J. of dairy Sci.* 9: 1050-1060
- COCHRAN, W. G. (1959) *Sampling techniques* Eds. Wiley and Sons. Inc. London Chapman and Hall. : 50 - 64.
- COLAS, G. (1975) Effects of initial freezing temperature addition of glycerol and dilution in the survival and fertilizing ability of deep

frozen ram semen. J. Reprod Fert. 42: 277 – 285

COLAS, G. (1979) 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 Prod. Sci. 6: 153 166

COLAS, G GUERIN, Y. (1981) A new method for frozen ram semen Theriogenology 16: 623 – 630

DAVIS, I. F. KERTON, D. J. McPHEE, S. R., WHITE, M. B. BANFIEL, J. C. CAHIL, L. P.(1984) Uterine artificial in ewes. In Reproduction in sheep (eds.) LINDSAY, D. R. PERACE, D. T. 304

DERIAVAUX, J. (1976) Reproducción de los animales domésticos Ed. Acribia: 184 – 200

DURAN DEL CAMPO, A. (1980) Anatomía, fisonomía de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Editorial Hemisferio Sur: 204

DZIUK, P. K. LEWIS, J.M. GRAHAM, E.F. MOYER, R.H. (1972) Comparison between natural service at an appointed time in the ewe J. Anim. Sci. 35 (3): 572 –575

EAGLESOME, M. D. MILLER, S. A. (1989) Prediction of fertility of bovine semen: Preliminary studies with the hamster egg penetration test. Theriogenology 31 (3) : 643 – 651

- EVANS, G. MAXWELL, W. M. C. (1987) In salamon's artificial of sheep and goats. Butterworths. Cap. 10 – 12: 85 – 11
- FISER, P. S. AINSWORTH, L. FAIRFULL, R. W. (1982) Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluent. Can. J. Anim. Sci. 62 : 425-428
- FISER, P.S. AINSWORTH, L. FAIRFULL, R.W. (1987) Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. Theriogenology 25 (5): 599 – 607
- FUKUI, Y. ROBERTS E.M. (1976) Fertility of non – surgical intra uterine insemination with frozen pelieted semen in ewes treated with protatagladin F 2. Proc Int. Cong. Of Tech Aust. 482 – 494
- GARNER, D. L. (1984) In vitro methods for estimating fertilizing capacity of sperm cel. 10 th. Inter. Cong. on Anim. Reprod. Artif. Insem.: 9 –15
- GRAHAM, E.F. SCHMEHL, M.K.L. EVENSEN, B.K. NELSON, D.S. (1978) Viability assays for frozen semen. Cryobiology 15: 242-244
- GROVE,D. (1977) Diagnóstico andrológico ambulante en el bovino en países cálidos. Traducido por Renner, E. Publicado por la Sociedad Alemana de Cooperación Técnica: 153 – 207
- HARESIGN, W. READ, S.R. (1986) A note on the use of laparoscopy for insemination of frozen – thawed semen in the ewe. Anim. Prod.

43: 553 –556

HARRISON, R.A.P. WHITE I.G. (1972) Glycolytic enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull, boar and ram their leakage after shock. J. Reprd. Fert. 30 : 105 –115

HEALEY, P. (1969) Effect of freezing on the utrastructure of the spermatozoom of some domestic animals. J. Reprd. Fert. 18: 21 – 27

HIRAO, K. (1975) A multiple anlysis on six measurement of bovine semen characteristics for fertility. Int. J. Fert. 20: 204 – 208

HOOD, R.D. FOLEY, C.W. MARTIN, T.G. (1970) Effects of cold shock dilution, glycerol and dimethyl dulfoxide on cation concentration in porcine spermatozoa. J. Anim. Sci. 30: 91- 94

HUNTON, J.R. (1987) Pregnancy rates following intra – uterine insemination with pellet or straw frozen ram semen. In Artificial Breeding of Sheep with Frozen Semen. Workshop (ed.) MAXWELL, W.M.C. 16 –24

JASK, D.S. SMITH, K. LITTLE, T.V. LEIN, D. FOOTE, R.H. (1989) A spectrophotometrinc procedure for the determination of objective measurement of equine spermatozoan motility. Theriogenology. 31 (5): 945-954

JONDET, R. RABADEUX, Y. (1976)Utilisation du test de thermoresistance

dans 18 appréciation de la valeur du sperme congelé de taureau.
Élevage et insémination. Public. UNCEIA 156: 13-19

KARAGIANNIDIS, A. (1976) The distribution of calcium in bovine spermatozoa and plasma seminal in relation to cold shock J. Reprod. Fert. 46: 83 – 90

KERTON, D.L. McPHEE, S.P. DAVIS, I.F. WHITE, M.B. BANFIELD, J.C. CAHILL, L.P. (1984) A comparison of insémination technique in Corriedale ewes. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 15: 701

KILLEN, I.D. CAFFERY, G.L. (1982) Uterine insémination of ewes with the aid of a laparoscope. Aus. Vet. J. 59: 95

LIGHTFOOT, R.J. SALAMON, S. (1969) Freezing ram spermatozoa by the pellet method 2. The effects of method dilution rate glycerol concentration and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 22: 1547 – 1560

LIGHTFOOT, R.J. SALAMON, S. (1970a) Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. 1 transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. J. Reprod. Fert. 22: 385-398

LIGHTFOOT, R.J. SALAMON, S. (1970b) Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. 2 The effects of method of insémination on fertilization and embryonic mortality J. Reprod. Fert. 22: 399- 408

- LINFORD, E. GLOVER, F.A. BISHOP, C. STEWART, D.L. (1976) The relationship between semen evaluation method and fertility in the bull. *J. Reprod. Fert.* 47: 283 – 291
- MAXWELL, W.M.C. (1984) Current problems and future potential of artificial insemination programmes. LINSAY, D.R. AND PEARCE, D.T. (eds.) 291 –298
- MAXWELL, W.M.C. (1986) Artificial insemination of ewes with frozen – thawed semen at a synchronized oestrus 2 Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 309 – 316
- MAXWELL, W.M.C. CURNOCK R.M. LOGUE, D.N. REED, H.C.B. (1980) Fertility of ewes following artificial insemination with semen frozen in pellets or straws. A preliminary report *Theriogenology* 14: 83 – 89
- MAXWELL, W.M.C. HEWITT, L.J. (1986) A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep *J. Agr. Sci. Camb.* 106: 191 – 193
- MAXWELL, W.M.C. WILSON, H.R. BUTLER, L.G. (1984) Fertility of ewes after intrauterine insemination with frozen semen *Anim. Prod. in Australia* 15: 448 –451
- MEOMON, M.A. OTT, R.S. (1981) Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World rev. of An. Prod.*

17 (1) : 19 - 15

MUELLER, J.P. (1986)Mejoramiento genético en la República Argentina.
Situación actual objetivos y estrategias de selección de ovinos
INTA EEA Bariloche :1 -14

NIEVES, J.P. (1980) Untersuchugen zur samenubertragung beim schaf
unter besonderer berucksichtigung der sperma
tiefgefriekonservierung. Inaugural disserttation. Zur erlangung
des grades eines Doctor mediceinae Veterinariae Durch die
Tierarztliche Hochschule Hannover:107

O ROURKE, P.K. HOWITT, C.L. (1986) Planning and design of
reproductive experiment. Proc. Aust. Soc. Anim. 16: 70

PACE, M.M. SULLIVAN, J.J. (1978) A biological comparison of the 5 ml
ampule and 5 ml french straw systems for packaging bovine
spermatozoa. Proc. seventh national Assoc. of Anim. Breed. Tech.
Conf. on Artif. Insem. Reprod. : 22

PACE, M.M. SULLIVAN, J.J. ELLIOTT, F.J. GRAHAM, E.A. COULTER, G.
(1981) Effects of thawing temperature number of spermatozoal
quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 ml french
straws.
J. Anim. Sci. 53 (3): 693-701

PALMA, G.A. (1988) Congelación de semen ovino para I.A. intrauterina
por laparoscopia en: Curso de congelación de semen ovino e

inseminación intrauterina por laparoscopia. MURTAGH, J.J. Y PALMA, G.A. (eds.) EEA Santa Cruz Convenio INTA – Provincia de Santa Cruz

QUINN, P.J. WHITE, I.G. (1966) The effects of cold shock and deep freezing on the concentration of major cations in spermatozoa 12: 263-270

SAACKE, R.G. WHITE, J.M. (1972) Semen quality test and their relationship to fertility. Proc. 4th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. NAAB: 22

SALAMON, S. LIGHTFOOT, R.J. (1977) Fertility of ram spermatozoa frozen by the method. 3. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing. J. Reprod. Fert. 22: 409-423

SALAMON, S. ROBINSON, T.J. (1962) Studies on the artificial of merino sheep. 1. The effects of frequency and season on insemination, age of the ewe, rams and milk diluents on lambing performance. Aust. J. Agric. Res. 13 (1); 52- 68

SALAMON, S. WILMUT, J. POGE, H. (1973) Deep freezing of boar semen. 1 Effects of diluent composition, protective agents and method of on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. 26: 219 – 230

SALEM, M.H. ABDEL – KEREIM, M.A. SELIM, A.R. PURSEL, V.G. (1988) Effects of incubation condition, inhibitors, 2-mercap toethanol

and testosterone on RNA synthesis a ram spermatozoa.
Theriogenology 30 (2) 339-347

SALISBURY, G.W. MERCIER, E. (1945) The reability of estimates of the proportion of morphologically abnormal spermatozoa in bull semen
J. Anim. Sci. 4: 174-178

SALISBURY, G.W. VANDERMARK; (1964) Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovinos. (Ed.) Acribia. Traducido por Santiago Luque, J.M. : 355-414

SHANNON, P.CURSON, B. (1987) The effects of ions and caffeine in the maintenance of motility of bovine spermatozoa diluted in egg yolk buffers. Anim. Reprod. Sci. 15: 161-168

SMITH, P. CORDON, J. (1967) Seasonal and breed variations in semen characteristics of ram in Irelan. Irish Vet. J. 21: 222-233

STELL, R.G. TORRIE, J.H. (1980) Principies and procedures of statistics a biometrical approach:86 -121

TEKIN, J. (1982) Untersuchungen zur samenubertragung beim schaf mit tiefgefrorenem sperma: einfluss verschiedener verdunner auf motilita, kopfkappenintegritat und sepha dex filtration von in minitub konfektioniertem sperma Pag. 49 Esc. Sup. De Med. Vet. De Hannover, Disertación.

WALKER, S.K. SMITH, D.H. LITTLE, D.L. WARNES, G.M. QUINN, P. SEAMAK, R.F. (1984) Artificial insemination and transfer of

embryos by laparoscopy. In *Reproduction in sheep* (eds.)
LINDSAY, D.R. PEARCE, D.T. 306-309

WATSON, P.F. (1981) The effects of cold shock on sperm cell
membranes. In *Effects of low temperature on biological
membranes* (eds.) MORRIS, G. CLARKE, J.

WATSON, P.F. 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. MARTIN, I.C.A. (1975) Effects of egg yolk glycerol and
the freezing rates on the viability and acrosomal structures of
frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 28: 153 – 159

WISHART, G.J. PALMER. (1986) The effect of cryopreservation at –
196°C on the viability of fowl and turkey spermatozoa assessed
in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 12: 317-324