

EFFECTO DE LA OSMOLALIDAD Y DE LA PROSTAGLANDINA F_{2α} SOBRE LA CRIOVIABILIDAD DEL SEMEN OVINO CONGELADO^a

Mario A. Acuña Aguilar^b
Carlos Vásquez Peláez^c
Everardo González Padilla^d

RESUMEN

Los objetivos del presente estudio fueron, determinar la crioviabilidad del semen ovino, congelado en diluyentes isotónicos e hipertónicos adicionados con prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), con base en los porcentajes de motilidad espermática (MOT) e integridad acrosómica (PAI) posdescongelado. Se utilizó un diseño factorial 2 x 5 x 2. Los factores incluidos fueron: a) osmolalidad 320 y 600 mOms/kg, b) concentración de PGF_{2α} 0, 15, 30, 150 y 300 µg/ml y c) tiempo de evaluación 0 y 120 min posdescongelado. El semen se recolectó mediante vagina artificial. La dilución se realizó considerando una concentración de 300 x 10⁶ espermatozoides móviles/dosis precongelación. El enfriamiento del semen a 5 C y el equilibrio del mismo se realizó en cuatro horas. El semen se envasó en pajilla francesa de 0.5 ml y se congeló en vapor de nitrógeno líquido. El descongelado fue en agua a 39 C durante 30 seg. Mediante el análisis de varianza se determinó que los diluyentes hipertónicos fueron superiores (p<0.05) a los isotónicos, tanto para MOT (34.9 vs 26.8%) como para PAI (47.2 vs 34.4%); para MOT las concentraciones de PGF_{2α} de 0, 15, 30 y 150 µg/ml, fueron superiores (p<0.05) a 300 µg/ml (33.6, 32.2, 32.1, 31.2 vs 25.4%), para PAI las concentraciones de 15, 30 y 150 µg/ml, fueron superiores (p<0.05) a las de 0 y 300 µg/ml (44.6, 48.8, 44.0 vs 31.5, 35.1%). A los 120 min de incubación a 38 C, se observó una disminución (p<0.05) en ambos parámetros y en todos los diluyentes. Se concluye que los diluyentes más adecuados para criopreservar el semen ovino, fueron los hipertónicos con 15, 30 y 150 µg/ml de PGF_{2α}.

PALABRAS CLAVE: Semen Ovino, Diluyentes, Crioviabilidad, Osmolalidad, Prostaglandina F_{2α}.

Tec. Fecu. Mex. Vol. 34 No. 2 (1996).

INTRODUCCION

La inseminación artificial (IA) ha sido una de las técnicas más efectivas para incrementar la producción pecuaria, a través de un rápido mejoramiento genético de los animales; sin embargo, para que esto fuera posible, fue necesaria la identificación de los machos genéticamente superiores, y la optimización del procesamiento del semen.

En la especie ovina, se han obtenido exitosos resultados desde finales de los años cincuentas al utilizar semen fresco diluido para la inseminación artificial (IA) de ovejas (1). A pesar de ello, la falta de identificación de carneros con alto mérito genético, así como la dificultad para atravesar el cérvix de la oveja al inseminarla, han sido los principales factores que limitan el uso y desarrollo de esta técnica, evitando de esta

manera, que la ovinocultura se beneficie con las ventajas que la IA ofrece. En cuanto al primer punto, mediante la utilización simultánea de un semental ovino sobresaliente en varios rebaños, y el empleo de la IA con semen descongelado, se podría conocer rápidamente y con mayor precisión su patrimonio genético. Por otra parte para el segundo punto, una de las alternativas propuestas es la de formular un diluyente, que permita preservar la calidad de los espermatozoides y que al mismo tiempo, facilite el paso de los mismos a través del cérvix (2,3).

Existen dos líneas de investigación en la formulación de diluyentes ovinos, una estudia los efectos del uso de soluciones hipertónicas en los diluyentes para criopreservar semen ovino (4,5,6), mientras que la otra, estudia los efectos de la adición de prostaglandinas a los diluyentes para congelar dicho semen (7,8,9). Ambas líneas de investigación tienen publicaciones alentadoras en forma independiente; sin

^a Recibido para su publicación el 21 de agosto de 1995.

^b Campo Experimental Mocochá, INIFAP-SAGAR Apdo. Postal 100 D Mérida Yucatán.

^c Proyecto Biometría y Estadística. CENID Microbiología, INIFAP-SAGAR Km 15.5 Carret. México-Toluca, Palo Alto México D.F.

^d Vocalía de Investigación Pecuaria, Serapio Rendón No.83 P.B. México, D.F.

embargo, la cantidad de espermatozoides por dosis de inseminación, continúa siendo elevada, lo que disminuye tanto la eficiencia del semental como la de la misma técnica. Por lo expuesto y debido a la falta de información, es importante estudiar en forma conjunta ambas líneas de investigación, lo que podría, en un futuro, ayudar a reducir la concentración espermática por dosis de inseminación sin detrimento en la fertilidad. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la osmolalidad y la adición de prostaglandina $F_{2\alpha}$ a diluyentes de semen ovino, a base de leche descremada, sobre la crioviabilidad espermática e integridad acrosómica posdescongelado.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Inseminación Artificial y Reproducción Animal, en Ajuchitlán, Qro., durante los meses de julio y agosto. Se seleccionaron seis carneros Merino Australiano por la alta calidad y elevada concentración espermática de sus eyaculados.

El semen se obtuvo con vagina artificial; los carneros se trabajaron una vez por semana, en seis ocasiones (réplica), obteniéndose un eyaculado de cada uno de ellos, determinándose volumen, concentración espermática y motilidad progresiva, así como la integridad acrosómica. Posteriormente, fueron diluidos a 35 C en una solución compuesta de lactosa (321 mM) y yema de huevo 80 y 20 % (v/v) respectivamente (4), se enfriaron hasta 5 C en dos horas. Una vez alcanzada esta temperatura, los eyaculados se mezclaron para manejarse como una sola muestra, la cual se dividió en dos fracciones, diluyendo cada una de ellas en uno de los siguientes diluyentes glicerolados: isotónico (320 mOsm/kg) o hipertónico (600 mOsm/kg), ambos preparados con leche de vaca reconstituida y descremada, según el método descrito por Fiser y col.(4); el pH se ajustó a 6.7 y la

concentración final de glicerol fue del 6 %. Los diluyentes glicerolados se añadieron al semen en forma fraccionada y en cantidades iguales cada 15 min, durante las dos horas que duró el periodo de equilibrio.

Cada muestra de semen diluido y glicerolado se dividió en cinco fracciones, las que fueron adicionadas con 0, 15, 30, 150 o 300 $\mu\text{g/ml}$ de prostaglandina $F_{2\alpha}$ por ml de semen (10) como sal de trometamina (Dinoprost)¹. La concentración espermática antes de la congelación fue de 300×10^6 espermatozoides móviles en 0.5 ml; el semen se envasó en pajilla francesa de 0.5 ml y se congeló en vapor de nitrógeno líquido (11). Después de siete días, se descongelaron en agua a 39 C, durante 30 seg seis pajillas (observaciones) por tratamiento, y se resuspendieron en 2.0 ml del diluyente isotónico sin glicerol. Con la ayuda de dos técnicos capacitados, pero ajenos al estudio, se determinó la motilidad progresiva subjetivamente, y la integridad acrosómica, según el método descrito por Pursel y col.(12), al descongelado (0 min) y a los 120 min de incubación del semen a 38 C. Ambos parámetros se estimaron por duplicado, mediante microscopía de contraste de fase.

Los datos obtenidos de motilidad espermática fueron transformados a arco seno para obtener normalidad, no así los de integridad acrosómica, ya que presentaron una distribución normal (13). Los resultados obtenidos de cada parámetro, se analizaron en forma independiente por el método de Cuadrados Mínimos, mediante el paquete estadístico SAS (14). El modelo matemático utilizado para describir la variación fue:

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

En donde: Y_{ijkl} es la respuesta de la variable dependiente motilidad espermática o integridad acrosómica. M es la media

poblacional. R_i es el efecto de la i -ésima réplica ($i= 1,2,\dots,6$). $\delta(i)$ es el error de restricción debido a réplica. O_j es el efecto fijo de la j -ésima osmolalidad ($j= 1,2$). P_k es el efecto fijo de la k -ésima concentración de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($k= 1,2,\dots,5$). T_l es el efecto fijo del l -ésimo tiempo de evaluación ($l= 1,2$). OP_{jk} , OT_{jl} , PT_{ki} y OPT_{jki} son los efectos de las interacciones dobles y triple entre los efectos antes descritos. $E_{(ijk)l}$ es el error aleatorio, NID ($0, \sigma^2$).

Las interacciones con réplica al no resultar significativas fueron sumadas al error ($p>0.05$).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se observa que con excepción de réplica, todos los efectos fijos y sus interacciones resultaron ser significativos al análisis de varianza ($p<0.01$), tanto para el porcentaje de motilidad espermática progresiva (MOT), como para el porcentaje de acrosomas intactos (PAI). En el Cuadro 2 se muestran las medias mínimo cuadráticas de los efectos principales para las dos variables dependientes, observándose que la hipertonicidad fue significativamente superior a la isotonicidad ($p<0.05$) para MOT y PAI. Con respecto a la concentración de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), en el Cuadro 2 se observa que para MOT las concentraciones de 0, 15, 30 y 150 $\mu\text{g/ml}$ fueron iguales pero superiores ($p<0.05$) a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para PAI, las concentraciones de 15, 30 y 150 $\mu\text{g/ml}$ fueron iguales pero superiores ($p<0.05$) a las concentraciones de 0 y 300 $\mu\text{g/ml}$.

En cuanto al tiempo de evaluación, en el Cuadro 2 se observa una disminución significativa ($p<0.05$) en ambos parámetros cuando el semen fue evaluado después de 120 min de incubación a 38 C.

En la Gráfica 1 se presenta el efecto conjunto de la osmolalidad y la concentración de $PGF_{2\alpha}$ sobre MOT, y se

observa en el diluyente isotónico una disminución en MOT conforme se incrementó la concentración de $PGF_{2\alpha}$, no así en el hipertónico, donde se aprecia un leve efecto benéfico sobre este parámetro hasta los 150 $\mu\text{g/ml}$ de $PGF_{2\alpha}$, para posteriormente disminuir con la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$. Es importante observar que la motilidad más baja en el hipertónico, fue similar a la más alta del isotónico. En cuanto a PAI (Gráfica 2) se observa en el diluyente isotónico un marcado efecto benéfico sobre este parámetro hasta los 30 $\mu\text{g/ml}$ de $PGF_{2\alpha}$, para después disminuir drásticamente con las concentraciones más elevadas, mientras que en el diluyente hipertónico, el PAI se benefició con 15, 30 y 150 $\mu\text{g/ml}$ de $PGF_{2\alpha}$. Cabe señalar que el PAI del hipertónico que no incluyó $PGF_{2\alpha}$ (O), fue similar al mejor observado en el isotónico.

En el Cuadro 3, se muestra que al considerar conjuntamente el efecto de los tres factores sobre ambos parámetros evaluados, los diluyentes que al descongelado resultaron ser los más adecuados para congelar semen ovino fueron los hipertónicos con 30 y 150 $\mu\text{g/ml}$ de $PGF_{2\alpha}$, ya que presentaron los porcentajes más elevados tanto para MOT como para PAI, siendo iguales ($p>0.05$) entre sí, mientras que a los 120 min de incubación a 38 C, los diluyentes que mejor mantuvieron la motilidad fueron los hipertónicos con concentraciones de $PGF_{2\alpha}$ de 15 hasta 150 $\mu\text{g/ml}$, los cuales fueron iguales ($p>0.05$) entre sí; en cuanto al PAI, los mejores fueron los hipertónicos con 15 $\mu\text{g/ml}$ seguidos por 30 $\mu\text{g/ml}$ de $PGF_{2\alpha}$.

DISCUSION

Estos resultados son similares a los publicados por varios autores, quienes al utilizar diluyentes hipertónicos a base de yema de huevo (15,16), leche de vaca (4) o sintéticos (5) observaron el efecto benéfico de la hipertonicidad sobre la motilidad espermática al descongelado del semen ovino.

CUADRO 1. ANALISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMICA

FUENTE DE VARIACION	CUADRADOS MEDIOS		
	G.L.	Motilidad	Integridad Acrosómica
Réplica	5	2.636	2.488
Error de Restricción	0	—	—
Osmolalidad	1	23824.341**	4296.03**
Prostaglandina F _{2α}	4	2909.344**	1254.22**
Osmol. X PGF _{2α}	4	1182.617**	384.9 **
Tiempo de Evaluación	1	21765.439**	3808.1 **
Osmol. X Tiempo de Evaluación	1	723.141**	468.1 **
PGF _{2α} X Tiempo de Evaluación	4	251.875**	180.6 **
Osmol. X PGF _{2α} X Tiempo Evaluación	4	105.495**	235.12**
Error	(1440)	18.460	
	(120)		0.55

** p < 0.01

() Grados de libertad del error

CUADRO 2. MEDIAS MINIMO CUADRATICAS DE LOS EFECTOS PRINCIPALES EXPRESADO EN PORCENTAJE

	M E D I A S	
	Motilidad	Integridad Acrosómica
OSMOLALIDAD		
320 mOsm/kg (Isotónicos)	26.8 ^a	34.4 ^a
600 mOsm/kg (Hipertónicos)	34.9 ^b	47.2 ^b
PROSTAGLANDINA F_{2α}		
0 µg/ml	33.6 ^a	31.5 ^a
15 µg/ml	32.2 ^a	44.6 ^b
30 µg/ml	32.1 ^a	48.8 ^b
150 µg/ml	31.2 ^a	44.0 ^b
300 µg/ml	25.4 ^b	35.1 ^a
TIEMPO DE EVALUACION		
0 min	34.8 ^a	46.4 ^a
120 min	27.0 ^b	35.2 ^b

ab/ Literales distintas en cada columna son diferentes

(p < 0.50)

Con respecto a la integridad acrosómica, aparentemente existen pocos estudios específicos del efecto de la osmolalidad sobre ésta; sin embargo, ya que la fertilidad del semen ovino criopreservado ha sido correlacionada positivamente con la integridad acrosómica (17), es importante

señalar el efecto benéfico que se observó sobre este parámetro al utilizar soluciones hipertónicas. El efecto benéfico de las soluciones hipertónicas parece deberse a: 1) una resistencia inducida hacia el «efecto de solución», esto es una protección que desarrolla la célula hacia la hipertonicidad o

CUADRO 3. MOTILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD ACROSÓMICA DEL SEMEN OVINO A LOS 0 Y 120 MIN DE INCUBACIÓN A 38 C

			Motilidad(%)		I.Acrosómica(%)	
			0	120	0	120
O		0	37.7 ^a	32.0 ^a	49.5 ^c	36.0 ^f
S		15	38.2 ^{ab}	32.8 ^a	57.0 ^b	49.7 ^a
M	HIPERTÓNICOS	30	38.2 ^{ab}	33.1 ^a	60.4 ^a	45.1 ^b
O	P	150	39.5 ^a	33.4 ^a	60.9 ^a	32.0 ^h
L	G	300	37.2 ^b	27.9 ^b	44.0 ^d	37.9 ^e
A	F					
L	2	0	35.5 ^c	29.3 ^b	30.3 ^h	10.5 ^j
I	α	15	33.4 ^d	24.4 ^c	38.0 ^f	34.0 ^g
D	ISOTÓNICOS	30	33.4 ^d	23.8 ^c	49.0 ^c	40.7 ^c
A		150	32.1 ^d	20.1 ^d	43.6 ^e	39.7 ^d
D		300	23.4 ^e	13.4 ^e	31.8 ^g	26.7 ^y

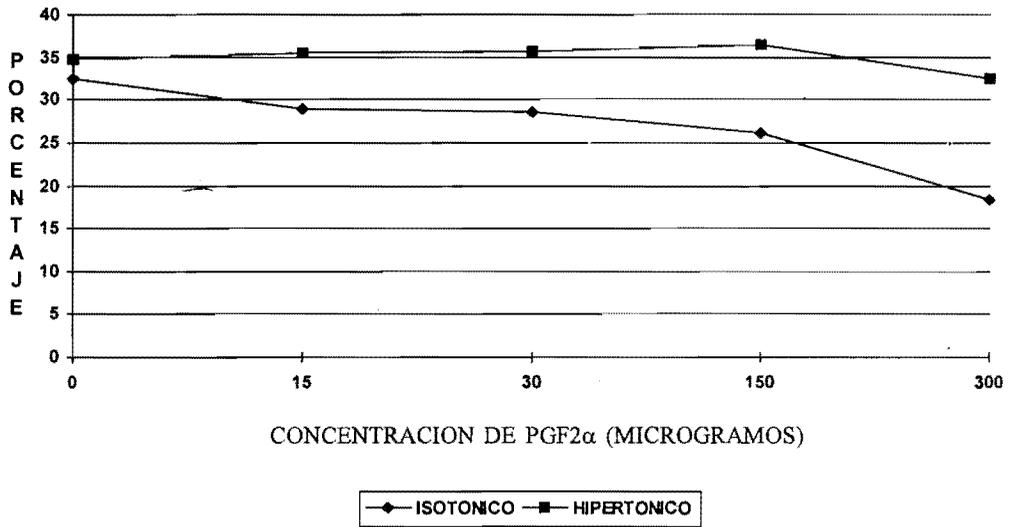
a,b,c,d,e,f,g,h,i,j / Literales distintas en cada columna son diferentes (p<0.05)

aumento en la concentración de solutos, que normalmente se presenta conforme el agua es removida del medio intra y extra celular durante la congelación y 2) una deshidratación parcial de los espermatozoides antes de ser sometidos a la congelación mediante un mecanismo de exósmosis, lo cual conduce a una menor formación de cristales de hielo en el medio intracelular (4,5,18). En ambos casos, los resultados serían un menor daño celular y por tanto una mayor sobrevivencia espermática. Sin embargo, además de la osmolalidad otros factores influyen sobre la sobrevivencia espermática tales como: tipo de crioprotector utilizado, tiempo de exposición de los espermatozoides a condiciones hiperosmóticas, temperatura máxima de congelación y condiciones del descongelado (19).

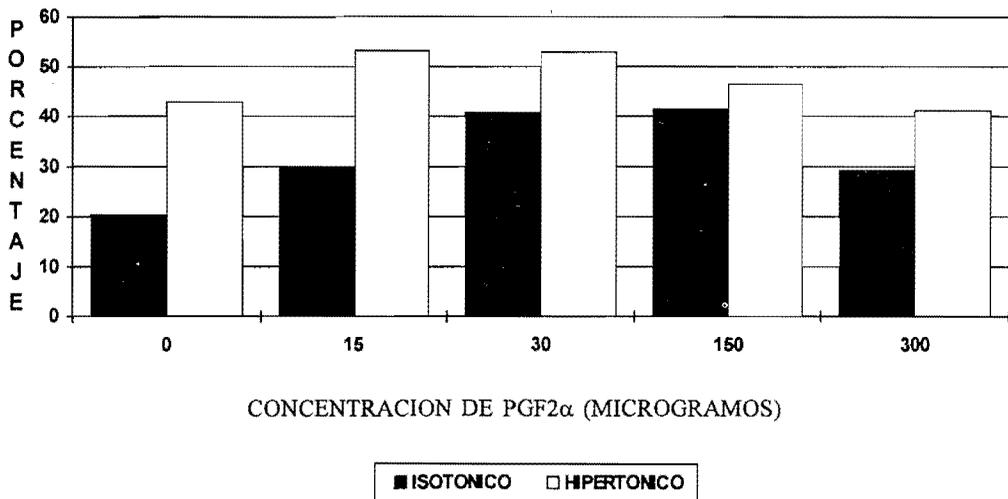
Pocos y contradictorios son los resultados que se han publicado para determinar el efecto de la adición de PGF₂ α sobre los parámetros aquí evaluados. De esta manera, mientras que algunos autores (20,21,22) han observado incrementos en la motilidad espermática y ninguna respuesta sobre la

integridad acrosómica, otros (23,10) determinaron que la adición con prostaglandinas hasta 600 μ g/ml no tuvo efecto detrimental sobre estos parámetros. Contrastar los resultados aquí obtenidos con los publicados por estos autores resulta difícil, debido a las distintas condiciones experimentales de los estudios. El carnero, es una de las especies que presentan mayor concentración de prostaglandinas en el eyaculado (24); sin embargo, el papel fisiológico que éstas desempeñan sobre la fertilidad no ha sido dilucidado. Las hipótesis propuestas, se apoyan en el efecto estimulador que las prostaglandinas ejercen sobre la contractilidad, al menos *in vitro* del cérvix de la oveja(3), y/o a que éstas, modifican el moco cervical para facilitar la penetración de los espermatozoides a través de éste, favoreciendo la fecundación (7,10). El hecho de volver a evaluar al semen, después de determinado tiempo de descongelado, es considerado como una prueba de calidad, tanto para el diluyente como para los espermatozoides, ya que indica el tiempo que éstos son capaces de mantener la motilidad y la integridad

GRAFICA 1. EFECTO DE LA OSMOLALIDAD Y DE LA CONCENTRACION DE PGF₂ α SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMATICA.



GRAFICA 2. EFECTO DE LA OSMOLALIDAD Y DE LA CONCENTRACION DE PGF₂ α SOBRE LA INTEGRIDAD ACROSOMICA.



acrosómica, factores importantes para la fertilidad, en un medio ambiente artificial como lo es el diluyente (25).

La disminución de MOT y PAI que normalmente se observa, está asociada con un agotamiento de las reservas energéticas del espermatozoide, así como a una desestabilización de la membrana celular, a nivel de los lípidos y de las proteínas, esto debido al estrés que produce el cambio de condiciones hipertónicas a condiciones isotónicas, que durante el proceso de congelación y descongelación sufren los espermatozoides (26,27,28).

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

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

EFFECT OF OSMOLALITY AND PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ ON FROZEN-THAWED RAM SPERMATOZOA

SUMMARY

The effect of osmolality at 320 and 600 mOsm/kg and prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) concentration 0, 15, 30, 150 and 300 $\mu\text{g/ml}$ on cryosurvival, as postthaw spermatozoa motility (MOT) and acrosome integrity (PAI), was studied after thawing and after incubation at 38 C for 120 min. Semen was collected from six Australian Merino rams using an artificial vagina once weekly for a period of six weeks, and was extended to get a concentration of $300 \times 10^9/0.5$ ml motile spermatozoa before freezing. The diluted semen was cooled from 35 C to 5 C in two hours. After equilibration for another two hours the semen was

packaged in 0.5 ml plastic straws, frozen in liquid nitrogen vapour and stored in liquid nitrogen. The frozen semen was thawed in water bath at 39 C for 30 seg. Least-square analyses revealed that hypertonic extenders with 0, 15, 30, 150 and 300 $\mu\text{g/ml}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentration resulted in the highest MOT ($p < 0.05$) immediately after thawing (37.7, 38.2, 38.2, 39.5 and 37.2%) and 0, 15, 30, and 150 $\mu\text{g/ml}$ after 120 min incubation at 38 C (32.0, 32.8, 33.1 and 33.4%). The best PAI immediately after thawing ($p < 0.05$) was observed in hypertonic extenders with 30 and 150 $\mu\text{g/ml}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentration (60.4 and 60.9%). After 120 min incubation at 38 C the best PAI was observed in hypertonic extenders with 15 $\mu\text{g/ml}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentration with 49.7% ($p < 0.05$). The proportional decrease in this parameter after incubation time was higher in hypertonic extenders, although the resulting integrities were still greater ($p < 0.05$) than those observed in isotonic extenders at this time. It was concluded that hypertonic extenders with 15, 30 and 150 $\mu\text{g/ml}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentration were the most suitable extenders to frozen-thawed ram semen.

KEY WORDS: Ram Semen, Extenders, Cryosurvival, Osmolality, Prostaglandin $F_{2\alpha}$.

REFERENCIAS

1. Graham E F, Crabo B G, Pace M M. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci. 1978. 47 (suppl 2): 80.
2. Colas G, Courrot N. Production of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in the sheep. Proc. Symp. Mang. Reprod. in Sheep and Goats. 1977. Madison, Wisc. 31.
3. Edqvist S, Einarsson S, Gustafsson B, Linde C, Lindell J O. The *in vitro* and *in vivo* effects of prostaglandins E_1 and $F_{2\alpha}$ and of oxytocin on the tubular genital tract of ewes. Int. J. Fertil. 1975. 20: 234.
4. Fiser P S, Ainsworth L, Langford G A. Effect of osmolality of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. Cryobiol. 1981. 18: 399.
5. Fiser P S, Ainsworth L, Fairfull R W. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. Can. J. Anim. Sci. 1982. 62: 425.
6. Fiser P S, Fairfull R W. Combined effects of glycerol concentration, cooling, velocity and osmolality of skim-milk. Theriogenology. 1986. 25: 473.
7. Edqvist S, Einarsson S, Gustafsson B. Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on sperm transport in the reproductive tract of the ewe. Acta. Vet. Scand. 1975. 16: 149.
8. Gustafsson B K, Edqvist S, Einarsson S. The fertility of deep-frozen ram semen supplemented with $\text{PGF}_{2\alpha}$. Acta Vet. Scand. 1975. 16: 468.
9. Gustafsson B K, Crabo B G, Graham E F, Memon M A. Effect of prostaglandins E_1 and $F_{2\alpha}$ on post-thaw survival and morphology of ram spermatozoa. Proc. 14th. Ann. Meet. Soc. Cryobiol. 1977. July 31, August 4, Minneapolis, Minn. 61.
10. Memon M A, Gustafsson B K, Graham E F, Crabo B G. Effects of prostaglandin supplementation on frozen-thawed ram spermatozoa. 10th. Inter. Cong. Anim. Reprod. A.I. 1984. Illinois. 201.
11. Almquist J O, Wiggin H B. Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. A. I. Digest. 1973. 21: 2.
12. Pursel V G, Johnson J A, Rampacek G B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J. Anim. Sci. 1972. 34: 278.

13. Steel R G D, Torrie J H. Principles and procedures of statistics, 2nd. ed. McGraw-Hill. 1980. Kogakusha.
14. Barr JA, Goodnight J H, Sall J P, Blair W H, Chilco D M. SAS Institute, Inc. 1979. Raleigh. North Carolina.
15. Salamon S, Visser D. Effect of composition of tris based diluents and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Aust. J. Biol. Sci. 1972. 25: 605.
16. Inskoop E K. Artificial insemination and preservation of ram semen in: Artificial insemination in sheep. West Virginia University Agricultural Experimental Station. 1974. Bull. 629: 5.
17. Smorag Z, Kareta W. In: Colas, G. and Courot, M., 1977. Reproduction of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in sheep. Proc. Symp. Manag. Reprod. in Sheep and Goats. 1974. Madison, Wisc. 31.
18. Meryman H T, Williams R J, Douglas M S T J. Freezing injury from «Solution Effects» and its prevention by natural or artificial cryoprotection. Cryobiol. 1977. 14: 287.
19. Gao D Y, Ashworth E, Watson P F, Kleinhans F W, Mazur P, Critser J K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. Biol. of Reprod. 1993. 49:112.
20. Gustafsson B K, Graham E F, Crabo B G, Pavelko M K, Wagner W C. Prefreeze supplementation of ram semen with PGE and PGF_{2α}. Effect of sperm vitality *in vitro* and on sperm transport in the ewe. Proc. 10th. Ann. Meet. Soc. Stu. Reprod. Texas, USA. 1976.
21. Anel L, Domínguez J C, Abad M. Prostaglandin supplementation of frozen-thawed ram semen. I. *In vitro* effects on spermatic individual motility and upward capacity. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin, Ireland. 1988:223.
22. Anel L, Domínguez J C, Abad M. Prostaglandin supplementation of frozen-thawed ram semen. II. *In vitro* effects on sperm survival and acrosomic integrity. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin, Ireland. 1988:224.
23. Marley P B, Richardson B A, Brown-Woodman P D C, Martin I C A, Withe I G. Prostaglandin supplementation of diluted ram semen in artificial insemination. Preliminary studies. Theriogenology. 1976. 6:655.
24. Marley, P B, Morris R S, Withe I G. Concentration of prostaglandins E₁ and F_{2α}, fructose and glycerylphosphorycholine in ram semen obtained by electro ejaculation or artificial vagina and in vesicular fluid. Theriogenology. 1977.8:33.
25. Foote R H. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: Past, present and future. J. Androl. 1982. 3: 85.
26. Holt W V, North R D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biol. of Reprod. 1994. 51:414.
27. Salamon S, Maxwell W M C. Frozen storage of ram semen. 1. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim. Reprod. Sci. 1995. 37:185.
28. Salamon S, Maxwell W M C. Frozen storage of ram semen. 2. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. Anim. Reprod. Sci. 1995.38:1