

# EVOLUTION OF THE WEIGHT OF THE OVARIAN STRUCTURE DURING THE GESTATION OF THE COW AND ITS RELATION TO THE DIOESTRUS PHASE

## SUMMARY

In the present investigation, a study is carried out on the statistical variations which occurred in the evolution of the weight of the ovarian structures during the gestation of the cow and its relation to those of the dioestrus phase. It is confirmed that there are no statistically significant differences between the total weight of the ovaries of gestating and non gestating cows, however the weight of the Corpus luteum of gestating cows is significantly greater than that found in the cows in Dioestrus phase.

The weight of the ovarian structures during gestation increases between the second and fourth months, and diminishes significantly in the fifth month. From then on, it is stabilized until the end of gestation. In this way, a significant increase in the content of follicular liquid is confirmed during the first month of gestation, specially appreciable in the left ovary.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) CALVO, F. (1978). *Estadística aplicada*. Ed. Deusto. Bilbao.
- 2) CUADRAS, C. M. (1982). *Problemas de probabilidades y estadística*. Vol. II. Ed. EUNIBAR. Barcelona.
- 3) GIBBONS, J. D. (1971). *Nonparametric statistical inference*. Ed. McGraw-Hill. New York.
- 4) GUTIERREZ CABRIA, S. (1978). *Bioestadística*. T. Flores. Madrid.
- 5) HAFEZ, E. S. E. (1984). *Reproducción e I.A. en animales* (4ª Ed.) Ed. Interamericana. México.
- 6) NALBANDOV, A. V. (1964). *Fisiología de la Reproducción*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- 7) RUIZ MAYA, L. (1977). *Métodos estadísticos de investigación*. Ed. INE. Madrid.
- 8) SACH, L. (1978). *Estadística aplicada*. Ed. Labor. Barcelona.

# ADICION DE PROSTAGLANDINAS AL SEMEN DESCONGELADO DE MORUECO. VALORACION DE SU EFECTO SOBRE EL ACROSOMA ESPERMATICO

Por L. Anel Rodríguez (1)  
J. C. Domínguez Fdez. Tejerina (1)  
J. C. Boixo Pérez-Holanda (2)  
M. Abad Gavín (1)

## INTRODUCCION

En la actualidad, y como consecuencia de numerosas investigaciones llevadas a cabo en las diferentes especies domésticas, se considera la integridad acrosómica como un parámetro básico en la evolución de la capacidad fecundante del material seminal, más importante incluso que la motilidad espermática, tal y como afirman Smorag y Kareta<sup>15</sup> para el semen de morueco y Strzezek y Slaweta<sup>18</sup> para el semen de verraco.

Pursel et al.<sup>12,13</sup> en el verraco, Saacke et al.<sup>14</sup> en el toro, Hurtgen et al.<sup>8</sup> en el caballo, Helleman et al.<sup>7</sup> en el conejo y Lu Zhao-Qi<sup>9</sup> en el morueco, contrastan este hecho al encontrar una correlación positiva, y altamente significativa en la mayoría de los casos, entre fertilidad e integridad acrosómica.

Un hecho perfectamente probado es que el acrosoma resulta dañado, en mayor o menor grado, durante el proceso de conservación a largo plazo del material seminal mediante congelación. Asti et al.<sup>3</sup>, mediante microscopía electrónica, constatan cómo la congelación produce lesiones en el acrosoma de morueco, lesiones que son mucho más severas en relación al semen de toro sometido al mismo proceso<sup>21</sup>. Srivastava y Kalra<sup>17</sup> y Tornòv et al.<sup>19</sup>, demuestran un descenso substancial de la capacidad enzimática de los acrosomas de células espermáticas de morueco, tras ser sometidas éstas a un proceso de congelación.

El aumento de la tasa de acrosomas alterados, junto a la consiguiente disminución de la capacidad enzimática de los espermatozoides, son hechos que justificarían sobradamente los bajos índices de fertilidad que se obtiene en la I. A. utilizando semen descongelado de morueco.

Este fallo, de cara a la fertilidad, que presenta el semen descongelado de morueco, se ha intentado paliar de diversas formas. Dentro de ellas podríamos señalar el uso de estimulantes espermáticos.

(1) Dpto. de Patología Animal: Sanidad Animal  
(2) CENSYRA. Valdepeñas

En este sentido, y con pruebas realizadas «in vitro», nosotros hemos comprobado como, si bien la suplementación con cafeína mejora las tasas de motilidad individual de los espermatozoides descongelados de morueco, esta substancia determina un aumento del porcentaje de acrosomas alterados presentes en las muestras seminales tratadas<sup>4</sup>.

Basados en este hecho, y teniendo en cuenta los resultados que hasta la fecha hemos podido comprobar con la adición de prostaglandinas al semen descongelado de morueco —efectos positivos sobre la M. i., progresión vertical y supervivencia espermática<sup>1,2</sup>—, abordamos la realización de la presente experiencia con vistas a investigar la posible repercusión que la utilización de prostaglandinas, en el momento de la descongelación, pudiera tener sobre la integridad acrosómica de los espermatozoides del semen de morueco. Evidentemente, ello nos permitirá evaluar, más correctamente, la idoneidad de estas substancias en cuanto a su posible uso en la práctica de la inseminación artificial de los óvidos.

## MATERIAL

En este trabajo, como en los precedentes de esta línea de investigación<sup>1,2,4</sup>, se ha empleado semen congelado en forma de «pellets», procedente de doce moruecos de raza Manchega.

El semen, con vistas a su congelación, fue previamente contrastado, y diluido en un medio Tes-Tris-Glucosa con un 6% de yema de huevo y un 3% de glicerol<sup>5</sup>. Los pellets (0,1 ml) son congelados en dos fases a  $-76^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$ , siendo almacenados en nitrógeno líquido, durante 18–24 meses hasta el comienzo de las pruebas.

La descongelación de los pellets, se realiza sobre 1 cc. de diluyente de descongelación, de igual composición al de congelación para el grupo de control, y que para los diferentes grupos y subgrupos experimentales lleva además las dosis de prostaglandinas correspondientes a cada caso.

Las prostaglandinas empleadas fueron:  $F_{2a}$  (5, 10, 15 y 20 ug/pellet),  $E_1$  (25, 50 75 y 100 ug/pellet) y  $E_2$  (10, 20, 30 y 40 ug/pellet).

## METODOS

La determinación cuantitativa de la tasa de acrosomas alterados se realiza mediante el uso de una técnica de tinción selectiva descrita por Watson<sup>20</sup> cuya metodología consiste en:

- Efectuar una extensión de la muestra seminal sobre un portaobjetos, dejándola secar al aire.
- Fijar la extensión mediante una solución salina de formol al 5%.
- Lavar con agua destilada.
- Teñir la extensión con una solución de Giemsa al 6% (Tabla I) durante 90 minutos.
- Lavar con agua corriente durante 15–20 minutos.
- Secado al aire.

Una vez teñidas las muestras, las preparaciones son observadas al microscopio óptico a 400 ó 1.000 aumentos, estudiándose 100 espermatozoides de distintos campos de la muestra, escogidos al azar, y anotándose el porcentaje de ellos que presentan algún tipo de alteración en el acrosoma.

El estudio acrosómico se realiza sobre una muestra de semen descongelado, sometido a una incubación aerobia a  $37^{\circ}\text{C}$ <sup>2</sup>. En esta muestra, se efectúan controles sucesivos a intervalos de 4 horas, hasta que la motilidad espermática desaparece.

Los grupos experimentales establecidos en base al tipo y dosificación de prostaglandina o mezcla de prostaglandinas empleadas, quedan patentes en la Tabla II.

Al grupo control se destina 12 «pellets» (uno de cada morueco), mientras que a cada grupo experimental corresponden 48 «pellets», 12 a cada subgrupo y dentro de estos uno de cada morueco.

El estudio estadístico de los resultados se realiza mediante la razón de varianzas del estadígrafo correspondiente a una distribución F, todo ello teniendo en cuenta los grados de libertad y siguiendo la metodología descrita por Snedecor<sup>16</sup>. En los casos en los que el nivel de significación superaba el 5%, se calculó la «mínima diferencia significativa» (M. D. S.) al objeto de establecer, detalladamente, entre qué medias concretas, tomadas dos a dos, existían diferencias de carácter estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, y cuyas medias quedan reflejadas en las tablas n.ºs 3, 4, 5, 6 y 7, muestran claramente como la adición de prostaglandinas al semen descongelado de morueco, no afecta cuantitativamente a las formas patológicas del acrosoma espermático, constatándose unos valores porcentuales de estas, muy uniformes en todos los subgrupos experimentales, con variaciones mínimas y no existiendo diferencias significativas en relación a los resultados obtenidos en el grupo control.

No obstante, y a partir de las cuatro horas de la experiencia, los valores encontrados para la acrosomía en los grupos suplementados con prostaglandinas, tienden a hacerse por lo general, ligeramente superiores a los del grupo control, aunque como ya apuntamos anteriormente, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

En la misma línea de nuestros resultados, se encuentran los que publican autores como Gustafsson et al.<sup>6</sup> y Marley et al.<sup>10</sup>, quienes constatan el hecho de que la adición de prostaglandinas al semen de morueco, no determina variaciones significativas entre las tasas de acrosomas alterados del grupo control y las correspondientes a las muestras seminales tratadas con prostaglandinas.

No obstante, tal y como han demostrado Memon et al.<sup>11</sup>, el empleo de prostaglandinas, añadidas al semen por encima de determinados niveles produce un aumento en el porcentaje de acrosomas alterados. Efectivamente, estos autores, suplementando con prostaglandinas, previamente a la congelación, el semen de morueco diluido ( $5^{\circ}\text{C}$ ), comprueban cómo, tras la descongelación y cuando utilizaban dosis superiores a los 600 ug/ml de las prostaglandinas  $F_{2a}$  y  $E_1$ , se produce un incremento estadísticamente significativo con respecto a los controles en el porcentaje de alteraciones acrosómicas, porcentaje que aumentaba proporcionalmente al tiempo de exposición a las prostaglandinas tras la descongelación. Memon et al.<sup>11</sup> señalan en el mismo trabajo, que los mecanismos, por medio de los cuales las prostaglandinas a dosis masivas ejercen estos efectos, son por el momento desconocidos.

En una evaluación global de nuestros resultados, y los obtenidos por los autores anteriormente citados, se puede concluir que la utilización de prostaglandinas hasta niveles muy superiores a los fisiológicos, aunque sin alcanzar determinadas concentraciones que pueden resultar tóxicas<sup>11</sup>, no influyen sobre las estructuras acrosómicas del semen descongelado de morueco, por lo que y en referencia a este parámetro, no existen inconvenientes de cara a la utilización de estas substancias en la inseminación artificial en la especie ovina.

TABLA I  
Solución giemsa para tinción selectiva de acrosomas. Watson, P. F. 20

Solución madre de Giemsa	3 ml
Tampón fosfato de Sorensen, pH 7	2 ml
Agua bidestilada	35 ml

TABLA II  
Codificación de grupos y subgrupos

GRUPO CONTROL		
	Subgrupo Ia	5 µg/pellet
GRUPO I (F <sub>2a</sub> )	Subgrupo Ib	10 µg/pellet
	Subgrupo Ic	15 µg/pellet
	Subgrupo Id	20 µg/pellet
	Subgrupo IIa	25 µg/pellet
GRUPO II (E <sub>1</sub> )	Subgrupo IIb	50 µg/pellet
	Subgrupo IIc	75 µg/pellet
	Subgrupo IIId	100 µg/pellet
	Subgrupo IIIa	10 µg/pellet
GRUPO III (E <sub>2</sub> )	Subgrupo IIIb	20 µg/pellet
	Subgrupo IIIc	30 µg/pellet
	Subgrupo IIId	40 µg/pellet
	Subgrupo IVa	5 µg + 25 µg/pellet
GRUPO IV (F <sub>2a</sub> + E <sub>1</sub> )	Subgrupo IVb	10 µg + 50 µg/pellet
	Subgrupo IVc	15 µg + 75 µg/pellet
	Subgrupo IVd	20 µg + 100 µg/pellet
	Subgrupo Va	5 µg + 10 µg/pellet
GRUPO V (F <sub>2a</sub> + E <sub>2</sub> )	Subgrupo Vb	10 µg + 20 µg/pellet
	Subgrupo Vc	15 µg + 30 µg/pellet
	Subgrupo Vd	20 µg + 40 µg/pellet
	Subgrupo VIa	25 µg + 10 µg/pellet
GRUPO VI (E <sub>1</sub> + E <sub>2</sub> )	Subgrupo VIb	50 µg + 20 µg/pellet
	Subgrupo VIc	75 µg + 30 µg/pellet
	Subgrupo VIId	100 µg + 40 µg/pellet
	Subgrupo VIIa	5 µg + 25 µg + 10 µg/pellet
GRUPO VII (F <sub>2a</sub> + E <sub>1</sub> + E <sub>2</sub> )	Subgrupo VIIb	10 µg + 50 µg + 20 µg/pellet
	Subgrupo VIIc	15 µg + 75 µg + 30 µg/pellet
	Subgrupo VIId	20 µg + 100 µg + 40 µg/pellet

TABLA III  
Acrosomia (0 horas). Acrosomas alterados (%). Resumen de resultados (medias)

Grupo Control	48,08 ± 1,57			
	Subgrupo a	Subgrupo b	Subgrupo c	Subgrupo d
Grupo I	48,75 ± 2,41	47,92 ± 1,79	47,25 ± 1,56	48,50 ± 1,72
Grupo II	47,92 ± 1,72	48,58 ± 1,92	48,08 ± 1,67	48,50 ± 1,90
Grupo III	48,08 ± 1,50	47,75 ± 2,04	47,67 ± 1,75	47,33 ± 2,21
Grupo IV	47,67 ± 1,14	47,58 ± 1,72	49,50 ± 2,22	49,08 ± 1,53
Grupo V	47,00 ± 1,60	47,83 ± 1,88	48,42 ± 2,17	49,33 ± 2,22
Grupo VI	48,75 ± 1,95	48,33 ± 1,77	47,25 ± 1,19	49,00 ± 1,68
Grupo VII	49,83 ± 1,60	49,50 ± 1,59	47,83 ± 2,37	48,92 ± 1,73

TABLA IV  
Acrosomia (4 horas). Acrosomas alterados (%). Resumen de resultados (medias)

Grupo Control	53,42 ± 2,15			
	Subgrupo a	Subgrupo b	Subgrupo c	Subgrupo d
Grupo I	53,08 ± 1,57	51,92 ± 2,15	50,67 ± 1,71	53,42 ± 1,77
Grupo II	53,25 ± 1,59	52,00 ± 1,41	53,17 ± 2,40	54,92 ± 2,09
Grupo III	54,42 ± 2,16	52,83 ± 2,45	51,92 ± 1,94	53,00 ± 2,20
Grupo IV	52,75 ± 1,83	52,67 ± 2,64	52,75 ± 1,89	54,17 ± 2,05
Grupo V	53,92 ± 1,78	53,75 ± 2,79	53,67 ± 2,50	54,83 ± 2,28
Grupo VI	54,58 ± 1,62	56,75 ± 1,69	52,75 ± 1,59	56,58 ± 1,75
Grupo VII	54,58 ± 2,17	54,83 ± 1,92	52,83 ± 2,40	54,25 ± 1,72

TABLA V

Acrosomía (8 horas). Acrosomas alterados (%). Resumen de resultados (medias)

Grupo Control	58,92 ± 1,42			
	Subgrupo a	Subgrupo b	Subgrupo c	Subgrupo d
Grupo I	55,83 ± 1,48	57,92 ± 2,20	57,00 ± 1,76	61,33 ± 1,52
Grupo II	59,50 ± 1,25	59,58 ± 2,28	62,08 ± 2,48	61,83 ± 1,84
Grupo III	59,08 ± 2,19	60,33 ± 2,13	60,67 ± 0,84	59,67 ± 1,25
Grupo IV	58,33 ± 1,71	59,50 ± 1,96	58,50 ± 2,16	60,25 ± 2,06
Grupo V	59,50 ± 1,77	59,67 ± 1,65	59,58 ± 1,75	60,92 ± 2,04
Grupo VI	60,73 ± 2,14	61,67 ± 2,24	60,00 ± 1,80	62,75 ± 1,18
Grupo VII	61,58 ± 1,92	60,08 ± 2,00	59,58 ± 2,59	60,42 ± 1,64

TABLA VI

Acrosomía (12 horas). Acrosomas alterados (%). Resumen de resultados (medias)

Grupo Control	63,87 ± 2,07			
	Subgrupo a	Subgrupo b	Subgrupo c	Subgrupo d
Grupo I	63,67 ± 1,12	62,55 ± 1,83	61,11 ± 1,21	64,83 ± 1,13
Grupo II	63,62 ± 1,74	64,12 ± 1,57	64,83 ± 3,00	65,00 ± 1,68
Grupo III	64,25 ± 1,64	63,12 ± 1,83	65,33 ± 1,98	63,25 ± 1,88
Grupo IV	60,67 ± 2,82	61,87 ± 2,18	66,12 ± 1,61	66,43 ± 1,24
Grupo V	64,00 ± 1,49	63,71 ± 1,27	64,37 ± 1,71	62,22 ± 1,45
Grupo VI	63,14 ± 1,17	61,00 ± 2,20	63,28 ± 2,09	64,86 ± 1,34
Grupo VII	63,43 ± 2,10	64,11 ± 1,53	64,17 ± 1,45	64,00 ± 0,96

TABLA VII

Acrosomía (16 horas). Acrosomas alterados (%). Resumen de resultados (medias)

Grupo Control	63,75 ± 1,93			
	Subgrupo a	Subgrupo b	Subgrupo c	Subgrupo d
Grupo I	64,67 ± 1,59	64,00 ± 0,82	65,25 ± 0,95	65,50 ± 1,02
Grupo II	66,33 ± 1,36	66,67 ± 1,42	67,00 ± 1,04	65,00
Grupo III	61,00	66,00 ± 1,32	63,50 ± 0,20	65,75 ± 1,64
Grupo IV	69,75 ± 1,04	66,00 ± 1,32	66,00 ± 3,22	64,50 ± 1,83
Grupo V	65,50 ± 1,02	65,67 ± 1,83	66,20 ± 1,28	67,67 ± 1,54
Grupo VI	69,50 ± 1,57	66,20 ± 2,17	65,40 ± 2,76	66,33 ± 1,45
Grupo VII	68,50 ± 1,57	67,33 ± 0,93	67,00 ± 1,76	67,50 ± 0,61

## RESUMEN

Mediante la utilización de una técnica de tinción selectiva, se realiza un estudio cuantitativo de los procesos degenerativos que afectan al acrosoma espermático en semen descongelado de morueco adicionado con prostaglandinas. De este estudio se deduce que las prostaglandinas  $F_{2a}$ ,  $E_1$  y  $E_2$ , añadidas posteriormente a la descongelación y a las dosis descritas para la presente experiencia, no determinan variaciones significativas del porcentaje de acrosomas alterados en relación al que muestra el grupo control.

## POST-THAWED RAM SEMEN ADDED TO PROSTAGLANDINS: EFFECT ON ACROSOME MORPHOLOGY

## SUMMARY

By the use of a selective stain technique, it is made a quantitative study of the degenerative process which affect the sperm acrosome of frozen-thawed ram semen added to prostaglandins. From this study is deduced that prostaglandins  $F_{2a}$ ,  $E_1$  and  $E_2$ , post-thawing add to the doses described for this experience, do not determine significative variations of the percentage of change acrosomes according to the control group.

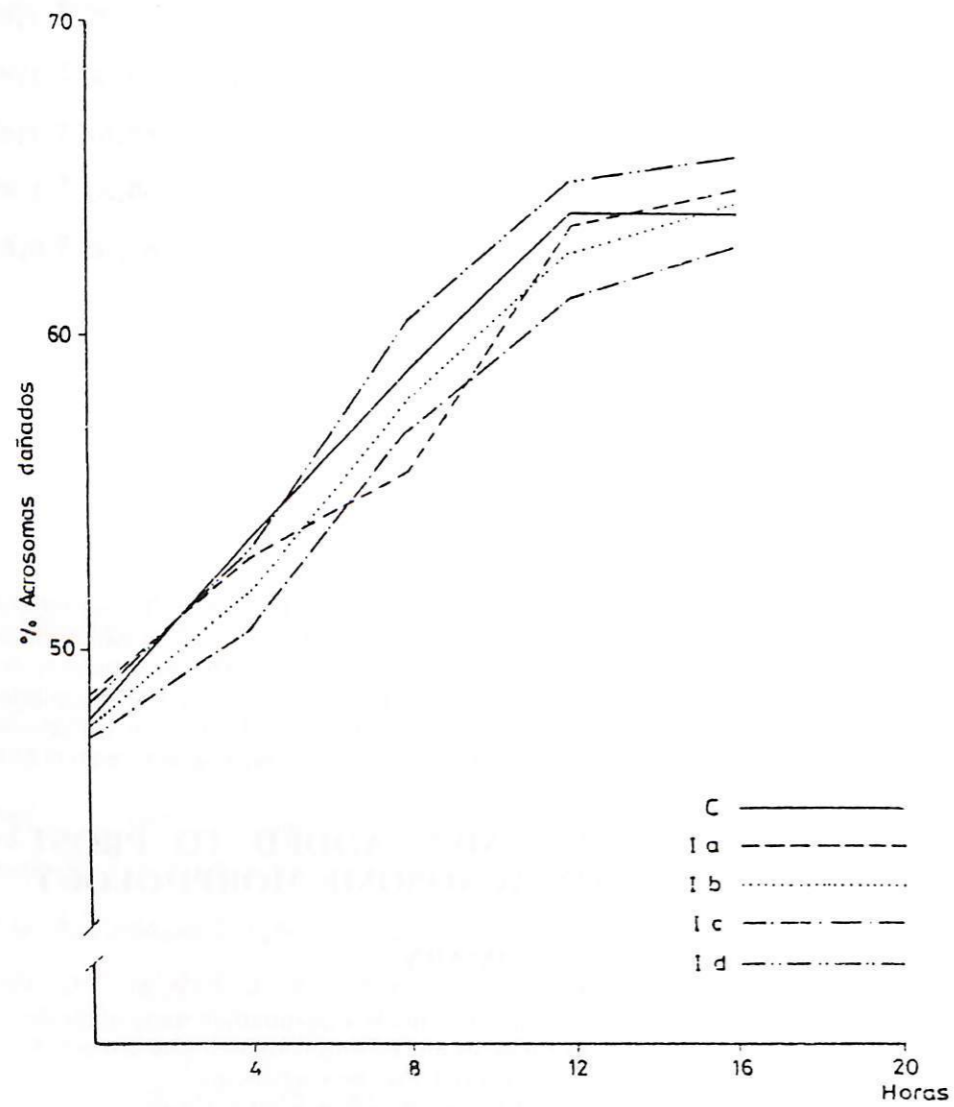


Fig. 1.- Grupo I (PGF<sub>2a</sub>). Gráfica de la evolución temporal de acrosomas alterados (%)

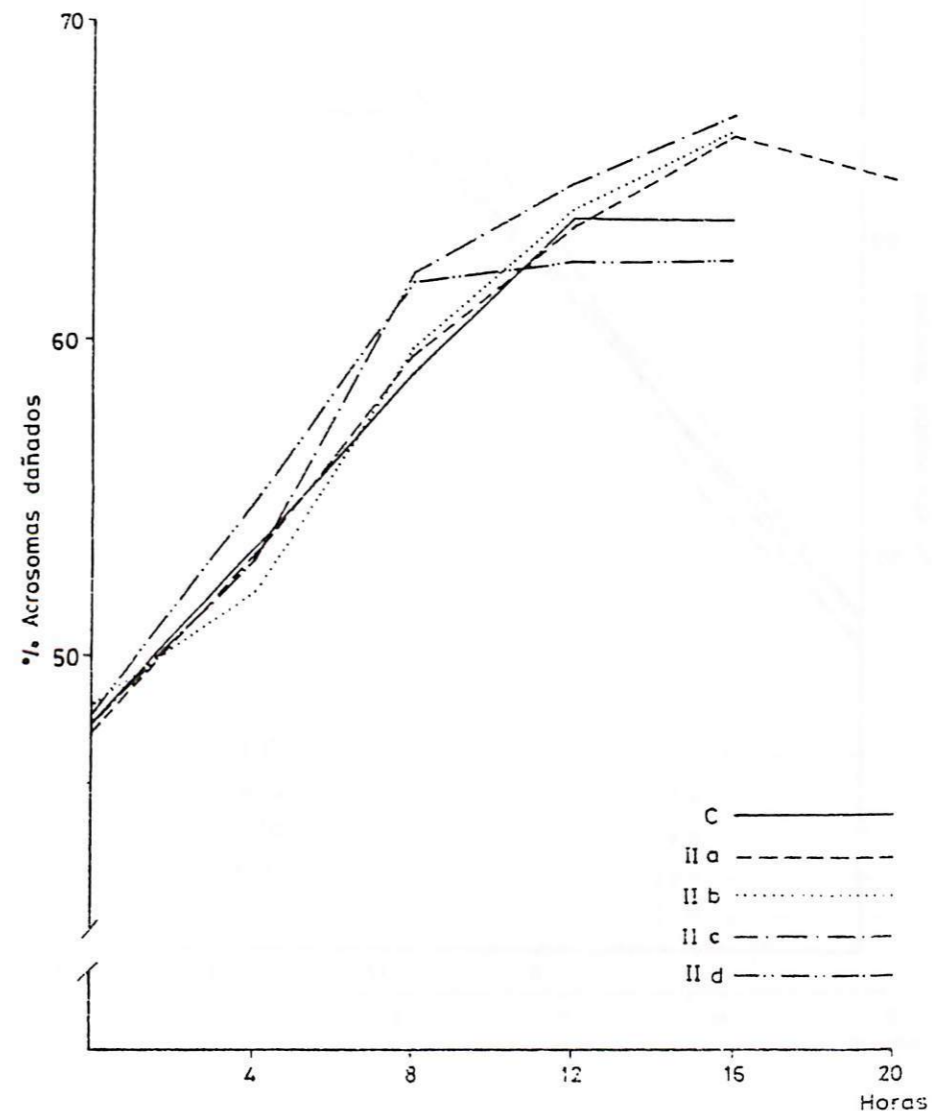


Fig. 2.- Grupo II (PGE<sub>1</sub>). Gráfica de la evolución temporal de acrosomas alterados (%)

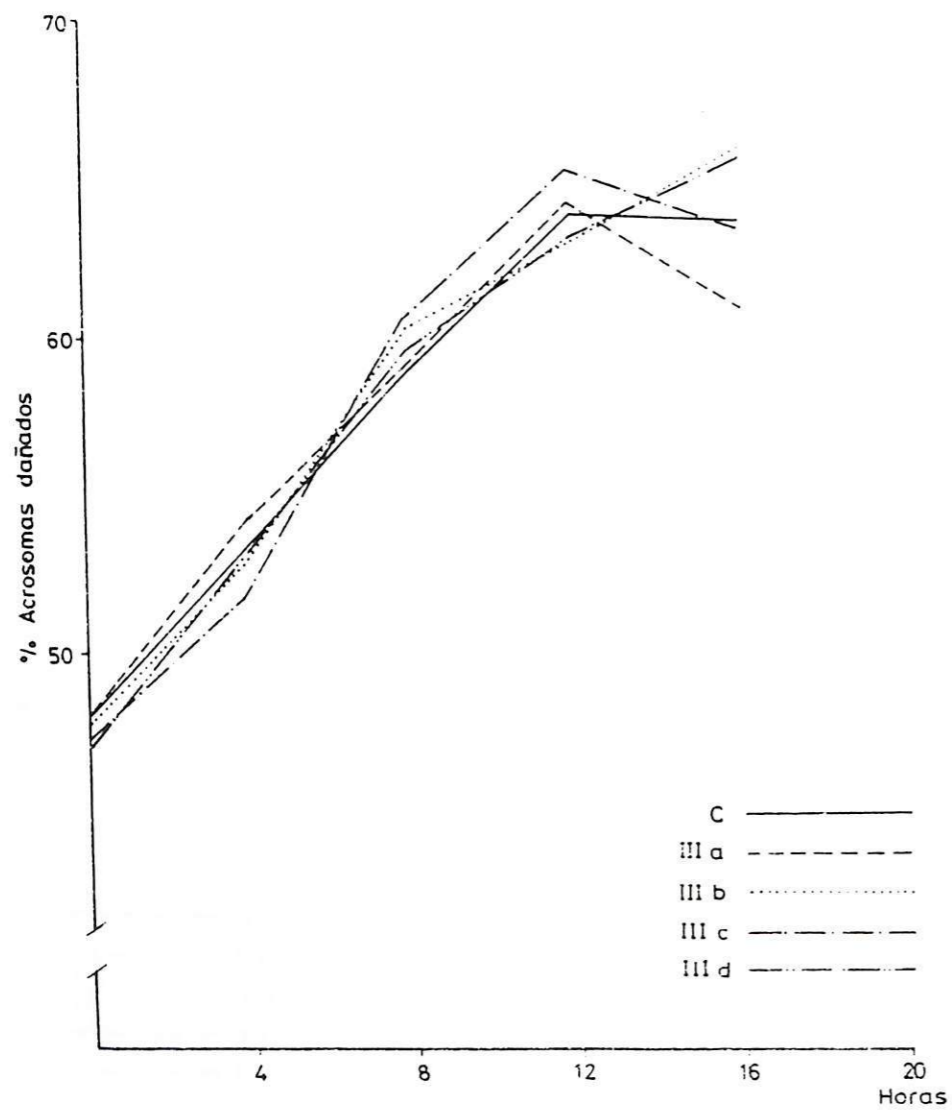


Fig. 3.-Grupo III (PGE<sub>2</sub>). Gráfica de la evolución temporal de acrosomas alterados (%)

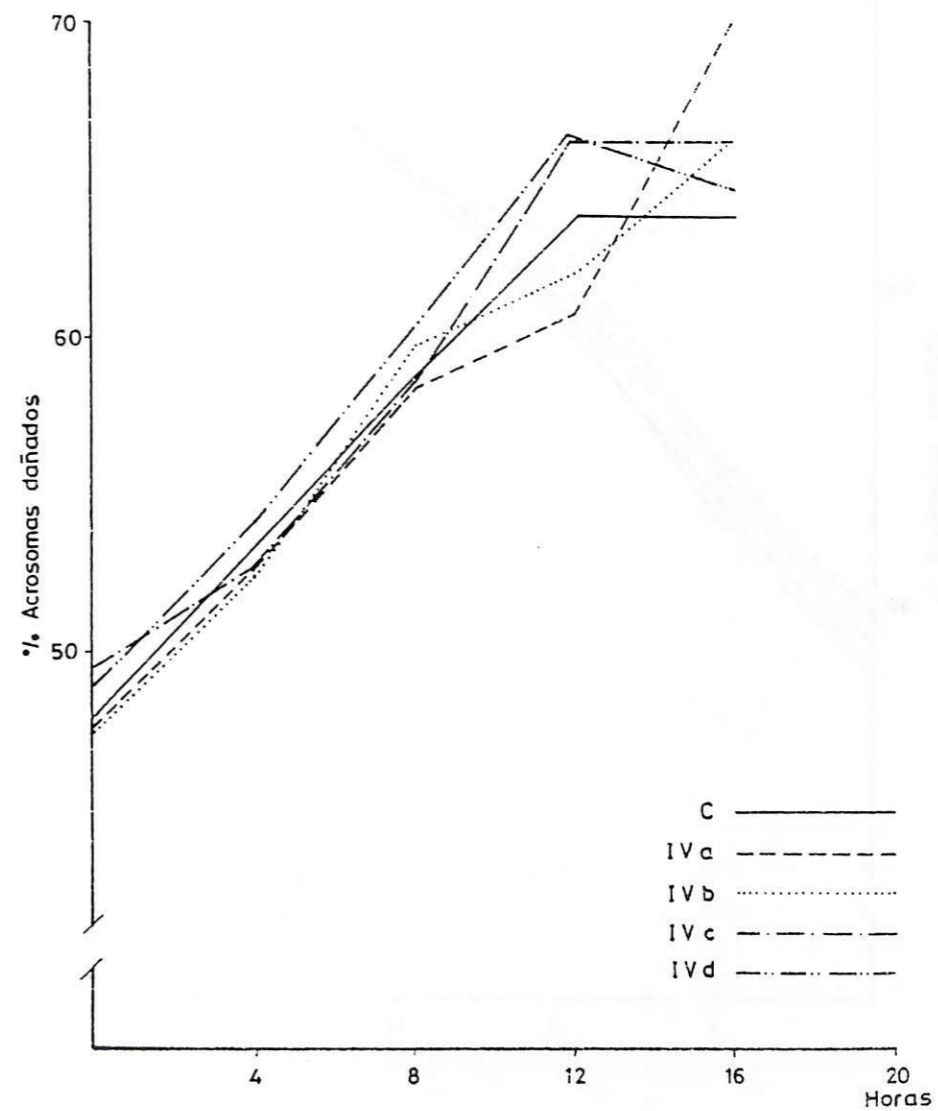


Fig. 4.-Grupo IV (PGs F<sub>2a</sub> + E<sub>1</sub>). Gráfica de la evolución temporal de acrosomas alterados (%)

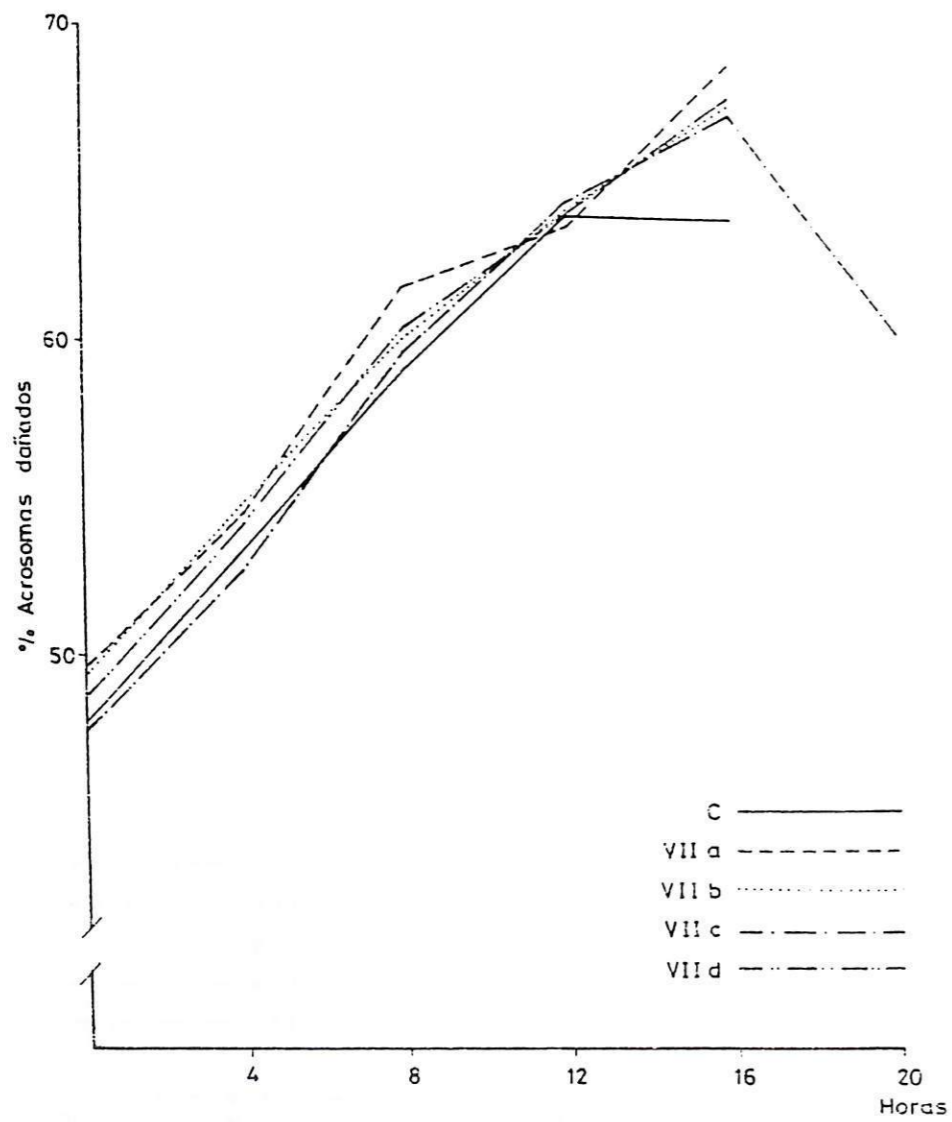


Fig. 5.-Grupo V (PGs F<sub>2a</sub> + E<sub>2</sub>). Gráfica de la evolución temporal de acrosomas alterados (%)

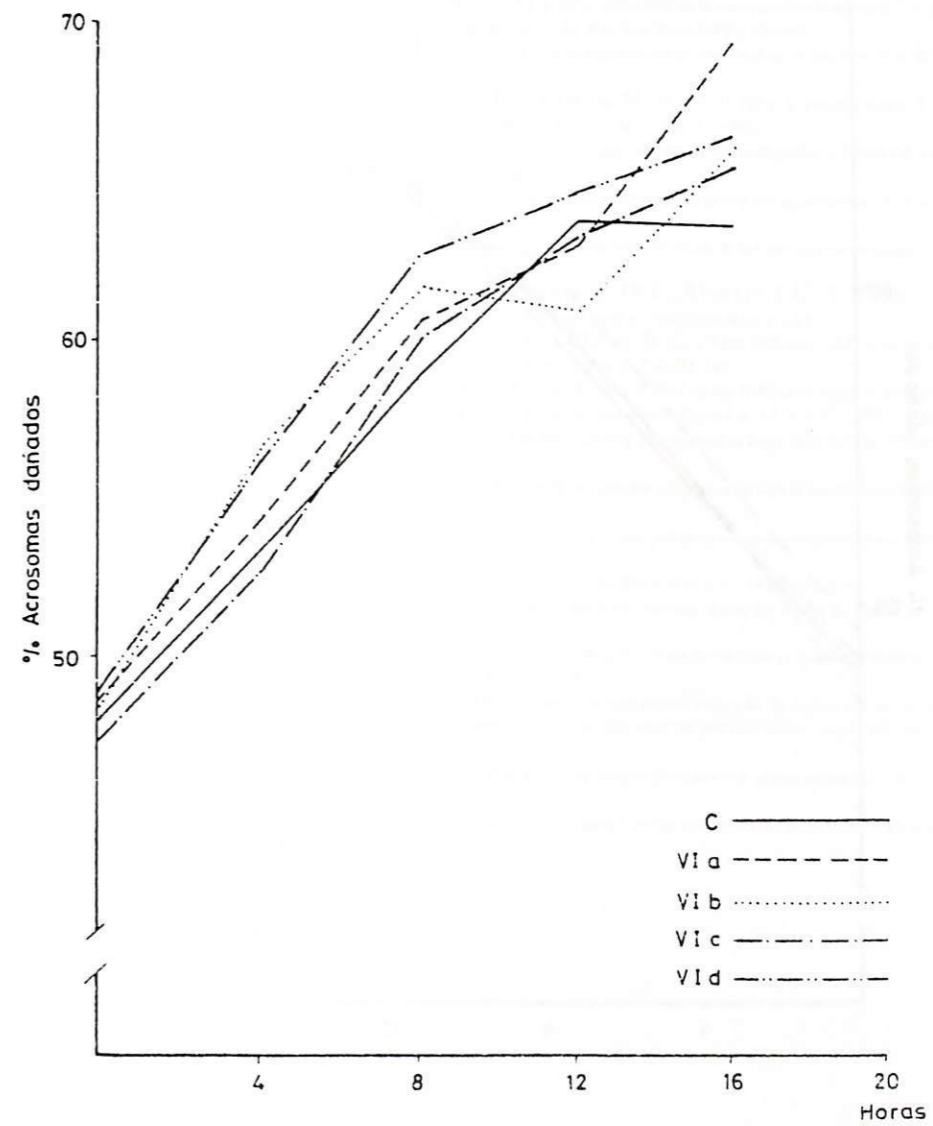


Fig. 6.-Grupo VI (PGs E<sub>1</sub> + E<sub>2</sub>). Gráfica de la evolución temporal de acrosomas alterados (%)

## BIBLIOGRAFIA

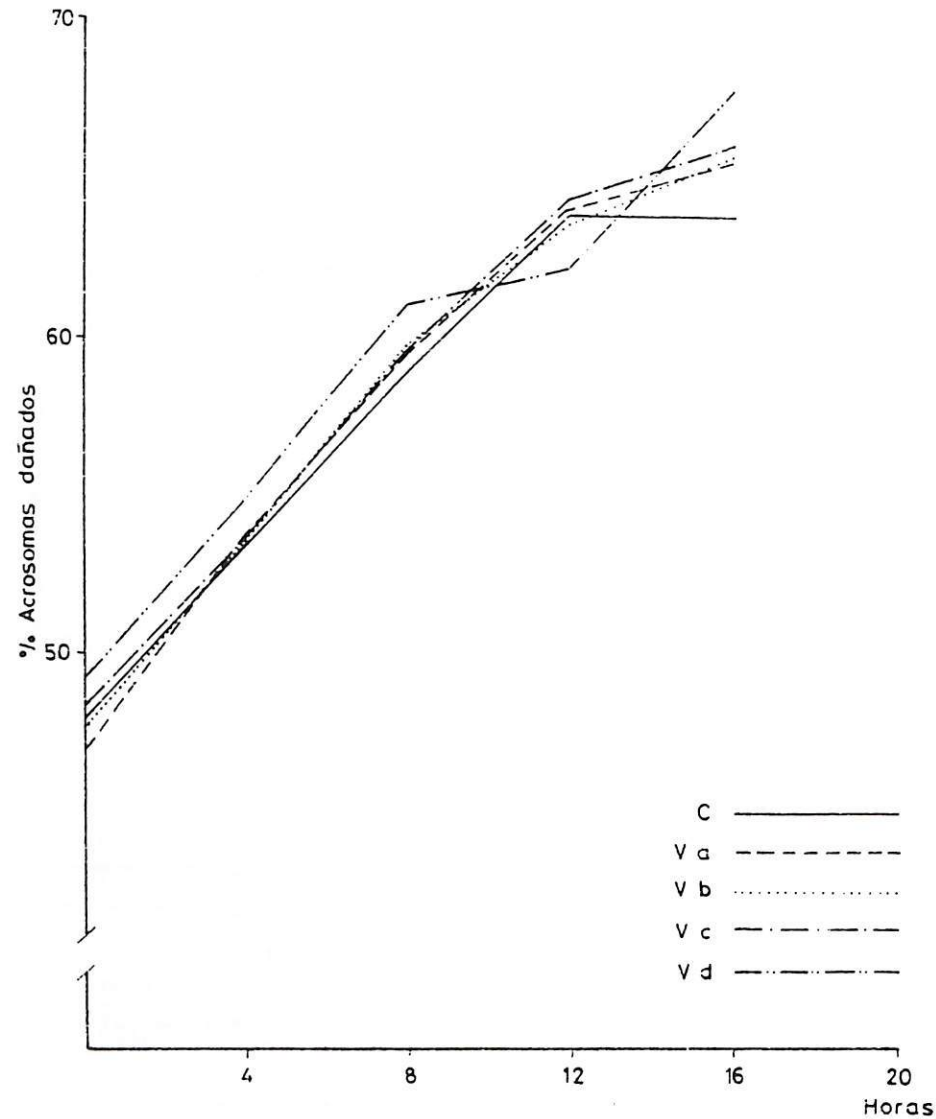


Fig. 7.-Grupo VII (PGs F<sub>2a</sub> + E<sub>1</sub> + E<sub>2</sub>). Gráfica de la evolución temporal de acrosomas alterados (%).

- 1) ANEL, L., DOMINGUEZ, J. C., BOIXO, J. C. y ABAD, M. (1986). Posibilidades de utilización de las prostaglandinas en la mejora de la motilidad individual (M.i.) del semen descongelado de morueco. *An. Fac. Vet. León XXXII*, (en prensa).
- 2) ANEL, L., DOMINGUEZ, J. C., ABAD, M. y POSADILLA, P. (1986). Efecto de las prostaglandinas sobre la progresión vertical y supervivencia espermáticas del semen descongelado de morueco. *An. Fac. Vet. León XXXII*, (en prensa).
- 3) ASTI, R. N. y GOKCEN, H. (1979). Effect of freezing in liquid nitrogen vapour on ram sperm ultrastructure. *Ankara Üniversitesi Vet. Fakültesi Dergisi* 26 (3-4): 30-9, Abstr.
- 4) DOMINGUEZ, J. C., ANEL, L., BOIXO, J. C. y ABAD, M. (1985). Influencia de la cafeína sobre la motilidad, supervivencia y acrosomía espermática del semen descongelado de morueco. *An. Fac. Vet. León XXXI*: 233-43.
- 5) GRAHAM, E. F., CRABO, B. G. y PACE, M. M. (1978). Current status of semen preservation in the ram, boar & stallion. *J. Anim. Sci.* 47 (suppl. 2): 80-118.
- 6) GUSTAFSSON, B. K., CRABO, B. G., GRAHAM, E. F. y MEMON, M. A. (1977). Effect of prostaglandins E<sub>1</sub> & F<sub>2a</sub> on post-thaw survival & morphology of ram spermatozoa. *Proc. 14th Ann. Meet. Soc. Cryobiol.*
- 7) HELLEMAN, C., KRAUSE, D. y WEITZE, K. (1979). Freezing of rabbit semen. I. Effect of glycerol, DMSO & a surfactant on acrosomes & motility. *Arch. Med. Vet. Chile* 11 (1): 32-6.
- 8) HURTTGEN, J. P. y JOHNSON, L. A. (1982). Fertility of stallion with abnormalities of the sperm acrosome. *J. Reprod. Fert. (suppl. 32)*: 15-20.
- 9) LU ZHAO-QI (1982). The quality of frozen ram semen measured by biochemical methods & the electron microscope. *Acta Vet. Zootech. Sinica* 13 (4): 241-6.
- 10) MARLEY, P. B., RICHARDSON, B. A., BROWN-WOODMAN, P. D. C., MARTIN, I. C. A. y WHITE, I. G. (1976). PG supplementation of diluent ram semen in A.I. preliminary studies. *Theriogenology* 6: 655.
- 11) MEMON, M. A., GUSTAFSSON, B. K., GRAHAM, E. F. y CRABO, B. G. (1980). Influence of PGs on acrosome morphology of ram spermatozoa. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Vol. III*: 148.
- 12) PURSEL, V. G., JOHNSON, L. A. y SCHULMAN, L. L. (1972). Loss of boar sperm fertilizing capacity associated with altered acrosome morphology during in vitro storage. *Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Vol. II*: 1.595-1.600.
- 13) PURSEL, V. G., REXROAD, C. E. y WALL, R. J. (1984). Relationship of competitive fertility to quality of boar semen. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Vol. II*: 63.
- 14) SAACKE, R. G., AMANN, R. R. y MARSHALL C. E. (1968). Acrosomal cap abnormalities of sperm from subfertile bulls. *J. Anim. Sci.* 27: 1.391-1.400.
- 15) SMORAG, Z. y KARETA, W. (1974). Evaluation of the fertility of frozen ram semen based on the state of the acrosomes. *Medycyna Weterynaryjna* 30 (11): 689-91.
- 16) SNEDECOR, G. W. y COCHRAN, W. G. (1978). *Métodos Estadísticos*. Edt. C.E.C.S.A., 1.ª ed., México.
- 17) SRIVASTAVA, A. K. y KALRA, D. B. (1980). Evaluation of acrosomal hydrolases during «in vitro» storage of ram semen. *Proc. 9th Congr. Int. Reprod. Anim. & A.I. Vol. V*: 153-6.
- 18) STRZEZEK, J. y SLAWETA, R. (1984). Application of chosen biochemical indexes for biological quality of boar semen stored at +15-18°C. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Vol. II*: 67.
- 19) TORŇOV, A., PAVLOVA, S. y DIKOV, B. (1979). Effect of deep freezing of ram semen on the hydrolytic & immunological properties of the acrosomal trypsin-like peptidase (acrosin). I. Distribution of the enzyme in the diluent, and acrosomal proteolytic activity after deep freezing. *Biol. Immunol. Reprod.* 1: 22-31.
- 20) WATSON, P. F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.*, 97: 12-15.
- 21) WATSON, P. F. y MARTIN, I. C. A. (1972). A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram & bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 28: 99-101.