

TRABAJOS ORIGINALES

PENETRACION DE ESPERMATOZOOS BOVINOS EN MUCUS CERVICAL Y SU RELACION CON ALGUNAS CARACTERISTICAS SEMINALES EN DIFERENTES SISTEMAS DE DESCONGELACION

Walter von Frey G. (MV, MS), Ricardo Vidal M. (MV), Alejandro Santa María S. (MV),
Mónica de los Reyes S. (MV)

PENETRATION OF BOVINE SPERMATOZOA IN CERVICAL MUCUS AND ITS RELATIONSHIP WITH SOME SEMINAL PATTERNS IN DIFFERENT THAWING METHODS

The pattern of sperm penetration in bovine cervical mucus was studied along with its relationship with seminal characteristics in three thawing systems. Bovine estral mucus was used and penetration was performed in a Kremer chamber. Semen samples consisted of 42 doses of frozen semen belongin to one bull wich were thawed according to three systems (40°C for 10 second; 75°C for 6 seconds and room temperature for 10 minutes). Motility and sperm abnormalities were determined in the thawed semen. Density and sperm abnormalities in cervical mucus were also studied.

Thawing at room temperature showed the lowest motility, penetration and density ($p \leq 0.05$). No differences were found in the mentioned variables between the fast thawing systems. There were no differences in spermatic abnormalities between the three thawing systems in semen or in mucus. When a comparison was made of sperm morphology in mucus and thawed semen, abnormalities in mucus were less, indicating a possible "filter" effect at the cervical mucus. Sperm penetration was positively associated with progressive movement and negatively with sperm abnormalities.

Los sistemas de evaluación potencial de la fertilidad generalmente se remiten a exámenes de semen, lo que si bien aporta valiosa información, permite conocer sólo una de las partes involucradas en el proceso coito-fecundación. Es por ello que ha despertado interés poder disponer de pruebas "in vitro" para estudiar algunos de los procesos involucrados en este fenómeno y poder estimar así en forma más certera la fertilidad.

Entre las pruebas que han adquirido importancia y difusión están los métodos de penetración espermática "in vitro"; es así como se han realizado pruebas de penetración espermática en mucus cervical (Montironi y col., 1981; Amite y col., 1982; Moghissi y col., 1982; Bueno y col., 1987) o en gel de poliacrilamida (Lorton y col., 1981; Arzumendi, 1985).

Departamento de Fomento de la Producción Animal.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15.
Santiago, Chile.

El objetivo de la presente investigación es determinar las relaciones existentes entre motilidad progresiva del semen bovino descongelado en tres sistemas diferentes y anomalías espermáticas, con penetración, densidad y anomalías morfológicas de los espermatozoos en el mucus cervical, empleando la prueba de penetración espermática en el mucus cervical.

MATERIAL Y METODOS

La prueba de penetración espermática se realizó mediante el método de Kremer (1965). El mucus cervical se obtuvo de hembras bovinas sanas en período estral. El mucus se caracterizó según Moghissi (1977), en elasticidad, celularidad, pH y penetración espermática en placa, determinándose además consistencia y cristalización. Las muestras de mucus cervical fueron colectadas y mantenidas en vasos precipitados estériles a 4°C, de acuerdo a Katz y col. (1978), retirándose sólo para el llenado de los tubos capilares.

Las pruebas de penetración se realizaron en tubos capilares para microhematocrito los que se llenaron con mucus por medio de aspiración, cada tubo se selló en uno de los extremos con masilla para moldear, dejándose en el extremo libre una pequeña protrusión de mucus que constituye la zona por la cual los espermatozoos penetran. La cámara de penetración empleada fue la descrita por Kremer (1965), la que se mantuvo durante el ensayo dentro de una cámara de incubación a 39°C.

El material seminal utilizado se obtuvo de 42 pajuelas plásticas (0,5 cc) de semen congelado (30×10^6 espermatozoos por dosis) provenientes de un toro de fertilidad probada. Las pajuelas se descongelaron según los siguientes sistemas: a 40°C por 10 segundos; a 75°C por 6 segundos y a temperatura ambiente (21°C) por 10 minutos. Inmediatamente después se estimó la motilidad progresiva (%) y luego se procedió a realizar frotis con el fin de determinar las anomalías espermáticas. Una vez descongelada la muestra, el depósito de la cámara fue llenado en un volumen constante de 0,1 cc de semen, registrándose como momento inicial (tiempo 0), aquel en que se produce el contacto entre el mucus y el semen. Los tiempos de lectura se realizaron a los 15, 30 y 45 minutos para proceder a determinar microscópicamente la distancia máxima de penetración de los espermatozoos de vanguardia; este valor se expresó en milímetros. Una vez finalizada la prueba, se estimó la densidad espermática dentro del tubo capilar (número de espermatozoos por campo de microscopio) a los 5, 10, 15 y 20 mm del tubo.

Posteriormente, el tubo se seccionó a los 5, 10 y 15 mm (segmentos) para extraer el contenido y realizar frotis correspondientes a cada segmento para la determinación de las anomalías espermáticas dentro del mucus. Además, fueron determinadas las anomalías del semen recién descongelado (fuera de mucus) para cada sistema de descongelación. Estas anomalías fueron agrupadas en: anomalías de acrosoma (GA), anomalías de cuello, tracto intermedio y cola (GB) y anomalías espermáticas totales (GC). Los frotis fueron teñidos con Giemsa (Díaz y Arancibia, 1971).

El estudio estadístico se realizó mediante análisis de varianza y las medias fueron comparadas empleando la prueba de Student Newman y Keuls. Se realizaron, además, correlaciones, regresiones simples, polinomiales y múltiples, entre algunas variables en estudio. Los valores expresados en porcentaje fueron previamente transformados según la fórmula de C.I. Bliss: ángulo = arco seno porcentaje. Asimismo, los valores de densidad espermática fueron transformados a raíz cuadrada pa-

ra distribuciones tipo Poisson truncados (Sokal y Rohlf, 1969).

RESULTADOS

La penetración espermática promedio para todo el ensayo fue de 29, 155 mm a los 45 minutos. Los resultados para los respectivos sistemas de descongelación se encuentran expresados en el cuadro 1.

CUADRO 1
PENETRACION ESPERMATICA (mm) A LOS
45 MINUTOS EN MUCUS CERVICAL BOVINO
EN TRES SISTEMAS DE CONGELACION
DE SEMEN

Sistema de descongelación	N	\bar{X}	DE	CV (%)
40°C por 10 seg	14	32,170 ^a	8,803	27,35
75°C por 6 seg	14	32,789 ^a	11,535	35,18
T° ambiente por 10 min	14	22,500 ^b	13,024	57,88
Total	42	29,155	11,970	41,05

Los subíndices diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sistemas de descongelación a 40°C por 10 segundos y temperatura ambiente por 10 minutos e igualmente entre 75°C por 6 segundos y temperatura ambiente, no encontrándose diferencias entre los sistemas a 40°C por 10 segundos y 75°C por 6 segundos, los cuales presentaron un comportamiento similar. Al analizar las funciones de regresión expresados en el gráfico 1 se puede observar que b1 y b2 de ambos sistemas de descongelación son muy similares.

La penetración en la descongelación a temperatura ambiente fue muy inferior a la obtenida con los otros dos sistemas, presentando una tendencia más lineal y menos acelerada, lo que se aprecia en el valor de los b.

La densidad espermática tuvo una media de 7,49 espermatozoos por campo. El sistema de descongelación a temperatura ambiente fue diferente a los de 40°C y 75°C ($p < 0,05$), no existiendo diferencias entre los sistemas de 40°C y 75°C. Esta característica resulta similar a la penetración espermática, encontrándose una densidad espermática levemente mayor para el sistema rápido de descongelación a altas temperaturas (75°C por 6 segundos) en relación al sistema de 40°C por 10 segundos. La des-

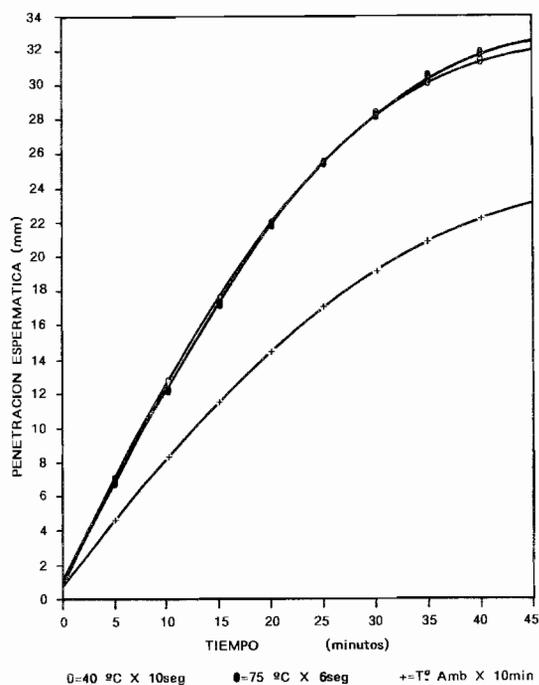


Gráfico 1. Penetración espermática (mm) bajo tres sistemas de descongelación.

congelación a temperatura ambiente tuvo densidades muy inferiores a los otros sistemas (cuadro 2).

Las funciones de regresión obtenidas para los diferentes sistemas de descongelación no se ajustaron a un modelo lineal ni cuadrático y, por lo tanto, no se expresan gráficamente.

La motilidad progresiva promedio para todo el ensayo fue de 43,7%. La motilidad obtenida en descongelación a 40°C por 10 segundos y 75°C por 6 segundos fue superior ($p < 0,05$) a la obtenida en

CUADRO 2
DENSIDAD ESPERMÁTICA -
ESPERMATOZOOS/CAMPO, EN MUCUS CERVICAL
BOVINO, EN TRES SISTEMAS DE
DESCONGELACION DE SEMEN

Sistema de descongelación	N	\bar{X}	DE	CV (%)
40°C por 10 seg	56	7,676 ^a	4,110	53,54
75°C por 10 seg	54	8,322 ^a	4,814	57,84
T° ambiente por 10 min	42	6,197 ^b	3,527	56,88
Total	152	7,497	4,280	57,192

Los subíndices diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$)

el sistema de temperatura ambiente por 10 minutos (cuadro 3).

CUADRO 3
MOTILIDAD ESPERMÁTICA PROGRESIVA
EN MUCUS CERVICAL BOVINO, EN TRES
SISTEMAS DE DESCONGELACION DE SEMEN

Sistema de descongelación	N	\bar{X}	DE	CV (%)
40°C por 10 seg	14	51,717 ^a	5,043	10,91
75°C por 6 seg	14	54,609 ^a	8,051	14,74
T° ambiente por 10 min	14	24,878 ^b	8,332	33,49
Total	42	43,735	15,369	35,14

Los subíndices diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$)

Las anomalías promedio obtenidos en semen recién descongelado, como dentro de mucus para todo el experimento fueron de GA: 16,08; GB: 8,38 y de GC: 18,54 (cuadro 5). No se encontraron diferencias significativas entre los tres sistemas de descongelación para anomalías de GA, GB y GC del semen descongelado y dentro del mucus. Sin embargo, se encuentran diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre las anomalías espermáticas fuera y dentro del mucus, tanto para GA, GB, GC encontrándose una disminución sustancial en la cantidad de espermatozoos morfológicamente anormales dentro del mucus cervical (cuadro 4).

Las anomalías espermáticas dentro del mucus tuvieron una tendencia a disminuir en la medida que aumentaba la distancia intracapilar (cuadro 5), encontrándose un aumento de las anomalías de GA y GC en la última sección estudiada (10 a 15 mm); sin embargo, GB si bien tuvo una tendencia a disminuir en los tres segmentos realizados, las diferencias entre los segmentos no fueron significativas.

La densidad espermática, especialmente en los primeros tramos del tubo, se encuentra estrechamente correlacionada con la penetración espermática y la motilidad progresiva. Además, las anomalías se encuentran respectivamente correlacionadas con la penetración espermática (cuadro 6).

DISCUSION

De acuerdo a estos resultados, la penetración espermática tuvo un comportamiento acelerado al inicio, para disminuir luego en forma paulatina a los 45

CUADRO 4
ANORMALIDADES ESPERMATICAS FUERA Y DENTRO DE MUCUS CERVICAL BOVINO
EN LOS SISTEMAS DE DESCONGELACION DE SEMEN

Sistema de descongelación		Fuera de Mucus (Semen descongelado)				Dentro de Mucus			
		N	\bar{X}	DE	CV (%)	N	\bar{X}	DE	CV (%)
40°C por 10 seg	GA	14	21,767	2,579	11,84	42	14,029	4,361	31,08*
	GB	14	13,095	1,610	12,29	42	7,038	3,787	53,80*
	GC	14	25,956	2,741	10,56	42	10,015	5,305	33,12*
75°C por 6 seg	GA	14	19,951	3,658	18,33	41	13,899	3,870	27,84*
	GB	14	12,722	1,981	15,57	41	6,693	2,439	36,44*
	GC	14	24,851	3,419	13,75	41	15,602	4,134	20,49*
T° ambiente por 10 min	GA	14	22,127	3,822	17,27	38	14,965	4,000	31,17*
	GB	14	13,907	1,258	9,05	38	6,305	2,475	39,25*
	GC	14	26,671	3,290	17,35	38	16,433	5,050	30,76*
Total	GA	42	21,282	3,451	10,21	121	14,279	4,292	30,05*
	GB	42	13,241	1,679	12,68	121	6,691	2,797	44,49*
	GC	42	25,800	3,179	12,30	121	16,006	4,828	30,14*

Asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,001$) entre anomalidades fuera y dentro de mucus en el mismo sistema de descongelación y dentro del mismo tipo de anomalidad:

GA: Anomalidades de acrosoma y cabeza; GB: Anomalidades de cuello, tracto intermedio y cola; GC: Anomalidades totales.

minutos (gráfico 1). Este comportamiento no lineal de la penetración espermática se asemejó a lo obtenido por Ulstein (1972) y Kesseru (1973), en mucus cervical y por Arzumendi (1985) en gel de poliacrilamida.

Kummerfeld y col. (1980) trabajando con semen congelado de toro encontraron un rango promedio de penetración de 13,3 mm a 28,7 mm a los 10 minutos. Mediante las funciones de regresión calculadas en el presente trabajo, se pudo establecer que las penetraciones espermáticas promedio a los 10 minutos en los sistemas de descongelación de 75°C por 6 segundos y 40°C por 10 segundos, fueron similares al rango inferior reportado por el citado autor. Las penetraciones promedio en estos dos sistemas son semejantes a los obtenidos por Ulstein (1972) para semen humano a los 30 minutos postmigración, y a los de Kummerfeld y col. (1981) quienes encontraron una distancia de migración para semen congelado bovino de 17,5 mm a los 15 minutos de incubación a 37°C. Beltrán (1985) obtuvo una distancia de penetración de espermatozoos bovinos de vanguardia de 39,5 mm después de una hora de incubación. Después de los 40 minutos la penetración espermática se estabiliza (gráfico 1) lo

que indica que el tiempo de estimación de la penetración no debiera exceder los 45 minutos.

Tredway y col. (1978) al trabajar en pruebas postcoitales (penetración *in vivo*) determinaron que la cantidad de espermatozoos contenidos dentro del mucus cervical estaba influenciada por la motilidad espermática. Situación que concuerda con los resultados de este estudio, en que la motilidad progresiva del semen descongelado según los tres sistemas se asoció fuertemente con densidad espermática, especialmente en los primeros segmentos del tubo capilar donde las correlaciones obtenidas fueron de 0,67 y 0,61 (cuadro 6). Esto explicaría en parte las diferencias en densidad espermática encontradas en los sistemas de descongelación utilizados, ya que a temperatura ambiente por 10 minutos se obtuvieron las menores motilidades y consecuentemente las densidades espermáticas más bajas. Los sistemas de descongelación a alta temperatura en tanto tuvieron las mayores motilidades y densidades espermáticas. Un comportamiento similar al descrito para la densidad, se encuentra entre la penetración espermática y motilidad progresiva cuyas correlaciones indican un alto grado de asociación entre estas características.

CUADRO 5
ANORMALIDADES ESPERMATICAS EN SEMEN
Y MUCUS CERVICAL BOVINO
SEGUN DISTANCIA INTRACAPILAR

	N	\bar{X}	DE	C (%)
Semen descongelado				
GA	42	21,282	3,451	16,21
GB	42	13,241	1,679	12,68
GC	42	25,826	3,179	12,30
Primer segmento mucus (0-5 mm)				
GA	42	15,125	3,505	23,17 ^a
GB	42	7,252	2,280	31,43 ^c
GC	42	16,969	3,713	21,80 ^d
Segundo segmento (5-10 mm)				
GA	42	12,177	3,928	29,80 ^b
GB	42	6,460	2,873	44,47 ^c
GC	42	14,883	4,533	30,45 ^c
Tercer segmento (10-15 mm)				
GA	37	14,568	5,245	36,00 ^a
GB	37	6,315	3,694	58,49 ^c
GC	37	16,190	5,999	37,05 ^{d,c}
Total				
GA	163	16,083	5,109	31,76
GB	163	8,379	3,942	47,04
GC	163	18,537	6,915	33,41

Los subíndices indican diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre segmentos.
GA: anomalías de acrosoma y cabeza; GB: anomalías de cuello, tracto intermedio y cola; GC: anomalías totales.

CUADRO 6
CORRELACIONES ENTRE PENETRACION ESPERMATICA, MOTILIDAD PROGRESIVA
Y DISTANCIA INTRACAPILAR CON ANORMALIDADES ESPERMATICAS
Y DENSIDADES ESPERMATICAS EN MUCUS CERVICAL BOVINO

	Penetración espermática	Motilidad progresiva	Distancia intracapilar
Anormalidades de acrosoma y cabeza	-0,4259**	-0,0385	-0,0595
Anormalidades de cuello, tracto intermedio y cola	-0,2760*	-0,0723	-0,1295
Anormalidades morfológicas totales	-0,4089**	0,0109	-0,0717
Penetración espermática	=	0,6006***	—
Densidad 5 mm	0,6970***	0,6725***	—
Densidad 10 mm	0,7581***	0,3752*	—
Densidad 15 mm	0,7581***	0,3752*	—
Densidad 20 mm	0,7700**	0,2205	—

* Significancia ($p < 0,05$)
** Significancia ($p < 0,01$)
*** Significancia ($p < 0,001$)

En el presente trabajo se confirma el efecto negativo sobre la penetración espermática, densidad y motilidad progresiva del sistema de descongelación a temperatura ambiente en comparación con los

sistemas de descongelación rápida en bovinos (Robbins y col., 1972; Olar y col., 1977; Fleming y col., 1976; Senger y col., 1976). Este efecto desfavorable no se presentó para las anomalías mor-

fológicas (GA, GB y GC) en los tres sistemas de descongelación tanto fuera como dentro del mucus cervical (cuadro 4).

Independientemente de los sistemas de descongelación utilizados en el presente trabajo, las anomalías espermáticas totales dentro del mucus cervical fueron 37,9% menores que las encontradas en semen recién descongelado. Resultados similares obtuvieron Bueno y col. (1987) al trabajar en mucus y semen bovino, reportando una disminución en las anomalías de 44,4% y Arzumendi (1985), utilizando gel de poliacrilamida como mucus sintético obtuvo un descenso en las anomalías espermáticas de 34,4%. Ehrenfeldt y Gross (1985) al trabajar con mucus cervical bovino almacenado a -196°C por 180 días y semen bovino descongelado, concluyen que los espermatozoos que migran a través del mucus presentaban un porcentaje significativamente menor de anomalías al agruparlos con el semen inicial, considerando por tanto al mucus cervical como un filtro biológico.

Las anomalías de cuello, tracto intermedio y cola, que constituyen la porción de mayor importancia en la motilidad intrínseca del espermatozoide, disminuyeron en mayor porcentaje que las anomalías de acrosoma y cabeza (cuadro 4), encontrándose sólo un 50,5% de las anomalías contenidas en el semen recién descongelado. Al respecto, Jeulin y cols. (1985) afirman que la selección espermática por el mucus cervical está basada en la integridad morfológica del aparato motriz. Este efecto de filtro que tendría el mucus cervical en términos de seleccionar o impedir el paso de los espermatozoos morfológicamente anormales, tal como ocurrió en este trabajo, puede entenderse bajo el mecanismo discutido por Davajan y Kharna (1970) donde la migración de los espermatozoides por los espacios o canales de agua y material en soluciones existente entre las macromoléculas del mucus cervical, seleccionaría los espermatozoos con adecuada morfología y motilidad. Además, hay que tomar en consideración los cambios morfológicos que los espermatozoos puedan sufrir dentro del mucus. La "selección" de los espermatozoides que se produce en el mucus se deduce además por los valores de las correlaciones negativas y las anomalías.

La alta correlación existente entre la motilidad progresiva y la penetración espermática revela que la primera característica, y aún siendo estimada en forma subjetiva está vigente como factor de estimación de la fertilidad (cuadro 6). Por otra parte, la motilidad progresiva y la penetración espermática están altamente correlacionadas con la densidad espermática, especialmente en los primeros tramos.

A la luz de los antecedentes aportados en el presente estudio los sistemas de calificación de se-

men congelado podrían ser enfocados para sistemas de descongelación rápida, incubando la muestra en mucus por 45 minutos y evaluar los espermatozoides de vanguardia a una distancia no más allá de los 10 mm del tubo capilar.

RESUMEN

Se estudió el comportamiento de la penetración espermática en mucus cervical bovino y su relación con algunas características seminales en tres sistemas de descongelación de semen. Para ello se utilizó mucus bovino obtenido en el período estral realizándose las penetraciones en la cámara de Kremer. El material seminal consistió en 42 dosis de semen congelado de un toro, las que se descongelaron según tres sistemas (40°C por 10 segundos, 75°C por 6 segundos y temperatura ambiente por 10 minutos), determinándose además la motilidad y anomalías espermáticas en el semen descongelado. Se determinó también la densidad y anomalías de los espermatozoides en el mucus cervical.

El sistema de descongelación a temperatura ambiente tuvo las menores motilidades, penetración y densidades, las que fueron diferentes a los otros sistemas de descongelación ($P < 0,05$) no encontrándose diferencias en las variables antes mencionadas entre los sistemas de descongelación rápida (40°C por 10 segundos y 75°C por 6 segundos). No se observaron diferencias en las anomalías espermáticas entre los tres sistemas de descongelación, tanto en el semen como dentro del mucus. Al comparar la morfología de los espermatozoides en el mucus cervical y en el semen descongelado, se encontró que las anomalías dentro del mucus fueron menores, lo que indica un posible efecto "filtro" del mucus cervical. La penetración espermática se asoció positivamente con la motilidad progresiva y negativamente con las anomalías espermáticas.

REFERENCIAS

- AMITE, A.; A. BERGMAN, G. YEDWAB, M.P. DAVID, T.Z. HOMONNAL, G. PAZ. Human sperm penetration into cervical mucus *in vitro*: Correlation between its quality, penetration capacity and velocity. *Gynecol. Obstet. Invest.* 14: 283-291, 1982.
- ARZUMENDI, G.G. Comportamiento de la penetración espermática de semen en gel de poliacrilamida y su relación con algunas características espermáticas. Tesis. Santiago. Escuela de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, 1985.
- BELTRÁN, P.B. Migración espermática en mucus cervical bovino, almacenado a -196°C como parámetro de calificación seminal. Tesis. Valdivia, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, 1983.

- BUENO, L.E.; A. BERNAL, W. VON FREY, L.H. BOSSHARD; G. ARZUMENDI, C. BARROS. Estudio de anomalías espermiáticas bovinas pre y postmigración en mucus cervical bovino fresco y medio de cultivo. *J. Vet. Med. A.* 34, 782-789, 1987.
- DAVAJAN, V.; K. KHARMA. Spermatozoa transport in cervical mucus. *Obstet. Gynecol. Surv.* 25: 1-43, 1970.
- DÍAZ, H.; C. ARANCIBIA. Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos. Santiago, Chile. Imprenta Vera Gianini, 1971.
- EHRENFELDT, J.; O. GROSS. Test de migración espermática en mucus cervical y su relación con anomalías espermiáticas. 10ª Reunión de la Sociedad Chilena de Producción Animal. Valparaíso, Chile. 3-4 octubre, 1985, p. 167.
- FLEMING, W.N.; T.T. OLAR, J.R. MITCHELL. Techniques for evaluation of frozen bovine semen at Curtiss Breeding Service. *In: Proceeding of the Sixth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction.* Milwaukee, February, p. 20-21, 1976.
- JEULIN, C.A.; A. SOUMAH, P. JOUANNET. Morphological factors influencing the penetration of human sperm into cervical mucus *in vitro*. *Int. J. Androl.* 8: 215-223, 1985.
- KATZ, D.F.; R.N. MILLS, T.R. PRITCHETT. The movement of human spermatozoa in cervical mucus. *J. Reprod. Fert.* 53: 259-265, 1978.
- KESSERU, E. *In vivo* sperm penetration and *in vitro* sperm migration test. *Fertil. Steril.* 24: 584-591, 1973.
- KREMER, J.A. Simple sperm penetration test. *Int. J. Fertil.* 10: 209-215, 1965.
- KUMMERFELD, H.L.; S.P. LORTON, R.H. FOOTE. Relationship of bull fertility to sperm migration and motility. *J. Androl.* 1: 81, 1980.
- KUMMERFELD, H.L.; S.P. LORTON, R.H. FOOTE. Relationship of spermatozoal migration in cervical mucus to bovine fertility. *J. Androl.* 2: 103-107, 1981.
- LORTON, S.P.; H.L. KUMMERFELD, R.H. FOOTE. Poliactilamida as a substitute for cervical mucus in sperm migration test. *Fertil. Steril.* 35: 222-225, 1981.
- MOGHISSI, K.S. Significance and pronostic value of post coital test. *In: The uterine cervix in reproduction.* Ed.: V. Insler and G. Bette Stuttgart George Thieme. Pub., p. 231, 1977.
- MOGHISSI, K.S.; S. SEGAL, O. MEINHOLD, S.J. AGRONOW. *In vitro* sperm cervical mucus penetration. *Studies in human and bovine cervical mucus.* *Fertil. Steril.* 37: 823-827, 1982.
- MONTRONI, P.C.; A. LANZA, M. FEDELE, M. BALERNA, A. CAMPAÑA. II. Test di penetrazione *in vitro* el moco cervicale ello studio della coppia sterile. *Minerva Ginecol.* 33: 325-335, 1981.
- OLAR, T.T.; W.C. BECKER, P.C. SENER. Effect of thawing rate and cold post-thaw temperature in bovine semen packaged in glass ampules. *J. Anim. Sci.* 44: 95-101, 1977.
- ROBBINS, K.; L.E. GERBER, R.G. SAACKE. Influence of thaw rate on maintenance of the acrosomal cap. *J. Anim. Sci.* 35: 253, 1972.
- SENER, P.L.; W.C. BECKER, J.K. HILLERS. Effect of the thawing rate and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. *J. Anim. Sci.* 42: 932-936, 1976.
- SOKAL, R.R.; J.F. ROHLF. *Biometry.* San Francisco, Freeman, 1969. 384-395.
- TREDWAY, D.R.; C.C. BUCHANAN, T.S. DRAKE. Comparison of the fractional post coital test and semen analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130: 647-652, 1978.
- ULSTEIN, M. Evaluation of a capillary tube sperm penetration method for fertility investigation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 51: 287-292, 1972.

Recibido en abril de 1988, aprobado en diciembre de 1988.