



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“COMPARACIÓN ENTRE EL LAVADO CAUDAL Y EL CORTE
SAGITAL DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO PARA LA EXTRACCIÓN Y
CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN OVINOS POST
MORTEM”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

JAIME IVAN ROSAS SANDOVAL

ASESOR:

M. en C. JORGE OSORIO AVALOS

REVISORES:

M.V.Z, EPO. BULMARO VALDÉZ RAMÍREZ
M. en C. ARTURO VÍCTOR GÓMEZ GONZÁLEZ

Toluca, México, septiembre de 2015



COMPARACIÓN ENTRE EL LAVADO CAUDAL Y EL CORTE SAGITAL DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO PARA LA EXTRACCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN OVINOS POST MORTEM

ROSAS, S.J; OSORIO-AVALOS, J.

RESUMEN

En la industria ovina en México, existen explotaciones productoras de pie de cría que cuentan y/o han adquirido ejemplares de alto valor genético y económico, que de forma aleatoria y espontánea presentan muerte súbita de carneros por diversas causas e incluso de forma accidental. El objetivo de este estudio estuvo encaminado a establecer protocolos viables para la obtención, procesamiento y preservación de espermatozoides a través de su criopreservación en ovinos post mortem, y a su vez la comparación de dos procedimientos: lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo. Se utilizaron un total de 28 muestras de testículos (divididos en dos grupos de 14 c/u) de machos ovinos de las razas Rambouillet, Pelibuey, Hampshire, Katahdin, Suffolk y Dorper, obtenidos del rastro municipal de Capulhuac, Estado de México. Los órganos fueron procesados en el laboratorio No. 4 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma del Estado de México. Para el comparativo de ambos los protocolos (corte sagital vs lavado caudal del epidídimo) se realizó un análisis de comparación de medias mínimo cuadráticas bajo un modelo de efectos fijos (raza, edad y condición corporal del ovino, método de procesamiento y mes de procesamiento) para las variables macro y microscópicas (volumen, motilidad en masa y progresiva, % de espermatozoides vivos y muertos, concentración espermática; en tanto que para la descongelación de los espermatozoides, las variables motilidad masal y % de espermatozoides vivos y muertos fueron analizadas. Los resultados indicaron que los valores promedio obtenidos de los epidídimos, fueron para el volumen: 0.59 ± 0.3 ml, motilidad en masa: $3.05 \text{ ml} \pm 0.62$, motilidad progresiva: $70.9\% \pm 17.4$, espermatozoides vivos: $73.2\% \pm 18.4$ y con una concentración espermática: $2,836.15 \times 10^7 \pm 2,799.26 \times 10^7$. Asimismo, se encontraron valores promedio inferiores al descongelamiento, disminuyendo la motilidad en masa en un 4% y un 8.75% de espermatozoides vivos. No se encontraron

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem

diferencias significativas entre ambos métodos para recolección de espermatozoides epididimarios (corte sagital vs lavado caudal del epidídimo) para todas las variables analizadas (volumen, motilidad en masa y progresiva, espermatozoides vivos), tanto para la evaluación previa y posterior a la congelación ($P>0.05$). Independientemente del método aplicado de la recolección de espermatozoides en la especie ovina, ambos procedimientos resultaron ser viables y efectivos para su criopreservación.

Palabras clave: lavado caudal del epidídimo, corte sagital del epidídimo, criopreservación.

1. INTRODUCCIÓN

La congelación de espermatozoides ovinos para su uso en inseminación artificial (I.A), es una tecnología que ha logrado grandes progresos en el campo de la reproducción y en el mejoramiento genético poblacional (Hafez, 1989; Salamon y Maxwell, 2000).

La recolección de semen en carneros se ha realizado por métodos convencionales, como es el uso de la vagina artificial y del electro-eyaculador, permitiendo el establecimiento de bancos de germoplasma provenientes de machos reproductores seleccionados de alto valor genético (Barrios, 2002).

El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones: almacenamiento y maduración espermática. La maduración o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante ocurren en la cabeza y cuerpo del epidídimo, así como del almacén de los espermatozoides maduros en la cola del epidídimo (Amann y Schanbacher, 1983, Hafez, 1989; Dyce *et al.*, 2007). Dentro del epidídimo se produce la maduración morfológica y funcional de los espermatozoides. La morfología de los espermatozoides sufre cambios durante el tránsito en el epidídimo, incluyendo alteraciones en la forma de la cabeza debido a la reducción en el tamaño de la tapa acrosómica y la pérdida de gotas citoplasmáticas unidos a la pieza intermedia (Hafez, 1989; Hewitt *et et al*, 2001). Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo que tengan motilidad y capacidad de fertilizar, dando la posibilidad en poco tiempo después de la muerte del animal a ser congelados para su posterior uso en la I.A (Ortiz, 2000; Barrios, 2002).

En la actualidad no se ha reportado en la literatura científica el nacimiento de corderos originados de espermatozoides frescos o congelados que fueran recolectados de la cola del epidídimo de machos ovinos; aunque ha habido algunos avances en la obtención de espermatozoides bovinos epididimarios usados en fresco para la fertilización in vitro (De Pauw *et et al.*, 2003; Chung, 1997), y en la congelación de la cola del epidídimo en ratas (Nakatsukasa *et al.*, 2001), primates (Soon Chye *et al.*, 2002), gacelas (Pérez-Garnelo *et al.*,

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem

2002), ciervos (Hishinuma *et al.*, 2003; Anel *et al.*, 2002; Ake *et al.*, 2010), rumiantes salvajes (Kilian *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2002), ungulados salvajes (Pérez de la Fuente año?, citado por Barrios, 2002), rinocerontes (Lubbe *et al.*, 1999), cerdos (Kikuchi *et al.*, 1998), caninos (Hewitt *et al.*, 2001) y felinos (Axnér *et al.*, 1999; Luvoni *et al.*, 2002).

Las células espermáticas almacenadas en el epidídimo son funcionalmente maduras y con la misma capacidad fecundante que las que proceden del eyaculado (Robaire y Hermo, 1998; Cooper, 1999; Ortiz, 2000; Soler *et al.*, 2003), convirtiéndose en una gran posibilidad en su investigación en ovinos después de la muerte en carneros, suponiendo una gran ventaja desde un punto de vista conservacionista del material genético y productivo.

En la industria ovina en México, existen explotaciones de pie de cría que cuentan y/o han adquirido ejemplares de alto valor genético y económico, que de forma aleatoria y espontánea se presenta una muerte súbita en carneros por diversas causas e incluso de forma accidental, siendo afectados por estos eventos sin tener la posibilidad de mantener y preservar germoplasma de estos reproductores, resultando de ello en pérdidas considerados dentro del proceso productivo-económico de la empresa ovina.

El objetivo de este estudio fue el establecer protocolos viables para la obtención, procesado y preservación de espermatozoides a través de su criopreservación en ovinos post mortem, así como de la comparación de dos procedimientos: lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo; además de abrir la posibilidad a corto y/o mediano plazo a los criadores de ovinos una alternativa de criopreservación de germoplasma en escenarios con eventos de muerte súbita de reproductores de alto valor genético.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Anatomía del testículo

Los testículos son las gónadas masculinas y están contenidas en una bolsa de piel denominada escroto (Sisson, 1993) que los protege y soporta. La función principal del escroto es regular la temperatura interna de las gónadas mediante la contracción involuntaria del músculo dartos, que recubre el escroto interna y basalmente (Hafez, 1989; Sheep Production Handbook, 2002; Dyce *et al.*, 2007). Son de formas ovoides, pesando de entre 300 a 500g dependiendo principalmente de la raza, edad y época del año, teniendo dos funciones fundamentales: producción de espermatozoides y producción de andrógenos o testosterona (Hafez, 1989., Sheep Production Handbook, 2002). Por acción de testosterona, los testículos bajan a la bolsa escrotal del cordero a partir del tercer mes de gestación de la oveja (Hafez, 1989; Ferreira y Pérez, 2001; Sheep Production Handbook, 2002).

Los testículos están recubiertos por dos capas serosas de la túnica vaginalis, y una capa de tejido conectivo denso e irregular, que constituye la túnica albugínea (Sisson, 1993; Dyce *et al.*, 2007). De la túnica albugínea emergen trabéculas de tejido conectivo que convergen en el mediastino ubicado en el parénquima testicular, y dividen al testículo en un número variable de lobulillos testiculares que contienen de 1 a 4 túbulos seminíferos contorneados. Los túbulos seminíferos se unen a la salida de cada lobulillo, y forman los túbulos rectos agrupados en el mediastino, que a su vez conforman la rete testis (Sisson, 1993). De la rete testis sale una docena de túbulos llamados vasos eferentes que convergen en la porción dorsal del mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo (Hafez, 1989; Sheep Production Handbook, 2002).

2.2. Función testicular.

Los testículos tienen dos funciones principalmente que son: a) esteroidogénesis o secreción de hormonas masculinas, como la testosterona y androstenediona a través del proceso de esteroidogénesis, en las células de Leyding (Hafez, 1989) y b) gametogénesis o producción

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem
de espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis, en los túbulos seminíferos (Chenoweth, 1997).

2.2.1 Esteroidogénesis

Las células de Leyding producen hormonas masculinas como respuesta a la estimulación por parte de la Hormona Luteinizante (LH), liberada por la hipófisis anterior, estimulada a su vez por la GnRH secretada en el hipotálamo (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997). La testosterona producida por las células de Leyding es necesaria, entre otras cosas, para la función de las células de Sertoli y la producción de espermatozoides (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997).

Las células de Leyding se localizan en el tejido intersticial en estrecha aposición con los vasos sanguíneos y linfáticos. Son células poliédricas cuyo citoplasma contiene numerosas vacuolas lipídicas y abundante retículo endoplásmico liso (Chenoweth, 1997).

La producción de esteroides está directamente relacionada con la cantidad de retículo endoplásmico liso presente en las células de Leyding, ya que ahí se produce colesterol a partir del acetato y se almacenan libres en compuestos esterificados (Ganong, 1990). La formación de pregnenolona ocurre en las mitocondrias como consecuencia de la escisión enzimática del colesterol, y pasa al retículo endoplásmico liso donde es rápidamente metabolizado a testosterona a través de la ruta intermediaria D₄ y D₅ por la 3 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (Johnson y Everitt, 1980).

2.2.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es la suma de las divisiones mitóticas y meióticas de células espermáticas precursoras, que ocurren dentro del túbulo seminífero y resulta en la formación de espermatozoides (Chenoweth, 1997), que inicia a partir de la pubertad (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997). El ciclo de espermatogénesis en el carnero adulto dura aproximadamente 61 días (Chenoweth, 1997).

Este proceso se lleva a cabo en los compartimientos basales y adluminales del túbulo seminífero que representan el 25% de epitelio tubular. No se dividen después de la pubertad y mantienen contacto con células vecinas (Johnson y Everitt, 1980) y las células germinales en desarrollo (Chenoweth, 1997). Así tenemos que las espermatogonias se ubican entre las células de Sertoli y la membrana basal del túbulo y otras están en las criptas intercitoplasmáticas de las células de Sertoli (Griswold, 1995).

Las células de Sertoli responden a la FSH regulando el número de espermatogonias que entran en el proceso de división celular (Griswold, 1995; Maddocks, 1995) y juegan un papel importante en la elongación nuclear y en la formación del acrosoma en las espermátides (Chenoweth, 1997). Bajo la acción de la FSH las células de Sertoli secretan glicoproteínas como transferrina, ceruloplasmina, inhibina y proteína transportadora de andrógeno ABP (Griswold, 1995).

La espermatogénesis incluye dos fases: a) la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren división celular hasta transformarse en espermátides y b) la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Hafez, 1989).

Las espermatogonias contienen el número de cromosomas característico de la célula somática de la especie (54 cromosomas en el caso del ovino, *ovis aries*) (Nadler et al., 1973b) y están categorizadas en: a) espermatogonias tipo A, que incluye espermatogonias A1 y formas celulares diferenciadas llamadas espermatogonias A2, A3, A4; b) espermatogonia intermedia o "In" derivada de A4; y c) espermatogonia tipo B que incluye B1 y B2 (Hafez, 1989).

La espermatogonia es una célula diploide que se divide mitóticamente solo para formar otra espermatogonia, excepto la espermatogonia tipo B2, que se divide para formar dos espermatocitos primarios. Deben ocurrir seis divisiones mitóticas para que se originen las espermatogonias "In", por esta razón siempre habrá un corte de espermatogonias

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem proliferativas A que se dividirán en tipos A y B para reemplazar los tipos B que se dividieron anteriormente (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997).

Como se muestra en la Figura 1, luego del crecimiento y desarrollo de los espermaticitos primarios siguen dos divisiones celulares. De la primera división se producen dos espermaticitos secundarios de cada uno de los espermaticitos primarios, y de la segunda división se producen dos espermátides de los espermaticitos secundarios (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997).

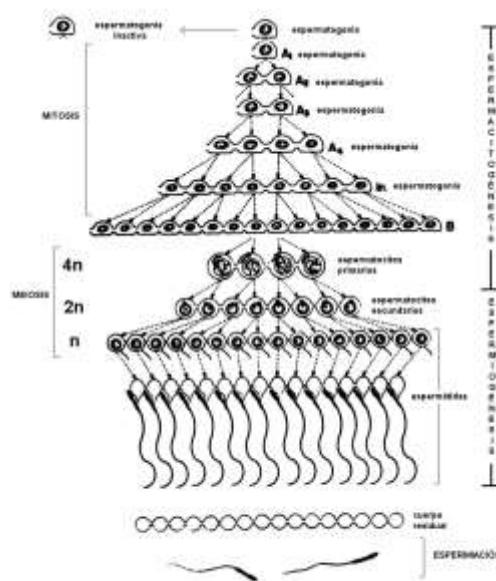


Figura 1. Representación esquemática de la espermatogénesis. (Tomado de Cunningham, 2003)

Durante la espermiogénesis ocurren cambios morfológicos como la formación del acrosoma, la condensación de la cromatina nuclear, el desarrollo de la cola y la pérdida del “Cuerpo Residual Regaud” (sobrante de la espermátide que no le sirve al espermatozoide maduro) (Hafez, 1989 y Chenoweth, 1997).

El control hormonal en machos adultos está dado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, a través del cual la GnRH secretada por el hipotálamo regula la liberación de LH y FSH. La LH

es liberada de 3 a 4 episodios diarios que persisten por aproximadamente 1.5 horas y tienen acción directa sobre la espermatogénesis a través de la estimulación por la producción de testosterona por las células de Leyding, y la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la espermiogénesis (Amann, 1983; Hafez, 1989). La testosterona es necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis y ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Amann, 1983; Hafez, 1989).

La espermatogénesis puede estar afectada por diversos factores, así tenemos que es afectada negativamente por la estacionalidad respecto a la época del año, el incremento de la temperatura escrotal que puede ocurrir por procesos de inflamación, fiebre o temperaturas ambientales muy elevadas. Cuando se afecta la espermatogénesis todos los estadios de espermatogonias mueren, las espermátides sufren anomalías estructurales y metabólicas, disminuyendo la producción de espermatozoides vivos y progresivos móviles, incrementándose las apatías por defectos de cabeza (Kastelic, 1997; Setchell, 1998).

Por otro lado, algunas afecciones congénitas o adquiridas pueden influir en el proceso espermatogénico, tales como la aplasia segmental del epidídimo, epididimitis, hiperplasia epitelial, criptorquidismo, hernia inguinal y varicocele se han asociado a cuadros de subfertilidad (Van Camp, 1997). Otros factores que influyen negativamente sobre la espermatogénesis son aquellas enfermedades que cursan cuadros clínicos sistémicos, deficiencias nutricionales y también el daño químico asociado a algunos agentes terapéuticos (Rodel, 1995).

2.3. Anatomía del epidídimo

El epidídimo es un túbulo elongado y tortuoso empaquetado en un saco de tejido conectivo que es una extensión de la túnica albugínea. Como se muestra en la Figura 2, anatómicamente el epidídimo consta de tres partes bien definidas: cabeza, cuerpo y cola (Sisson, 1993, Dyce *et al.*, 2007). La cabeza es la parte más grande, recorre el polo dorsal del testículo y desciende en forma de asa unos 2.5 a 3 cm de la superficie dorso lateral del testículo. El cuerpo del epidídimo se extiende hacia el polo distal del testículo como una

banda de 1 cm de ancho y se une firmemente a la cara caudo-medial del testículo. La cola del epidídimo tiene forma cónica y se une estrechamente por su base mayor al polo distal del testículo (Hafez, 1989; Sisson, 1993; Sheep Production Handbook, 2002; Dyce *et al.*, 2007).

Las convoluciones del epidídimo van disminuyendo en amplitud progresivamente desde la cabeza al cuerpo, en el cual se aprecia una constricción delgada de la túnica albugínea; pero a nivel de la cola aumentan el diámetro del túbulo y el tamaño de las convoluciones (Hafez, 1989; Sisson, 1993; Sheep Production Handbook, 2000; Dyce *et al.*, 2007).

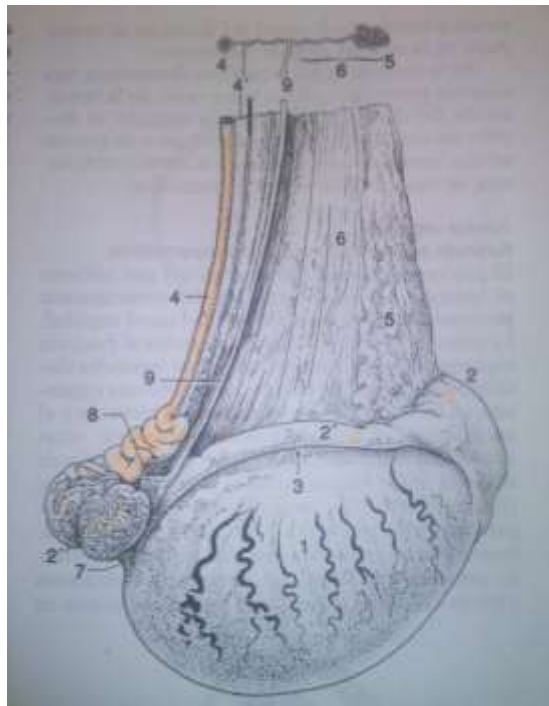


Figura 2. Vista lateral del testículo derecho de un carnero. 1. Testículo; 2. Cabeza del epidídimo; 2'. Cuerpo del epidídimo; 2''. Cola del epidídimo; 3. Bolsa testicular; 4. Conducto deferente; 4'. *Mesoductus deferens*; 5. Plexo pampiniforme; 6. Mesorquio; 7. Ligamento propio del testículo; 8. Ligamento de la cola del epidídimo; 9. Borde cortado del pliegue que conecta la capa visceral y parietal de la túnica vaginal. (Tomado del Dyce. *et al.* 2007).

2.4 Funciones del Epidídimo

Las funciones del epidídimo son el transporte y la maduración de los espermatozoides (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997), los cuales, a través del pasaje por los conductos eferentes y el epidídimo, adquieren la habilidad de tener movimiento progresivo lineal y la capacidad de fertilizar (Johnson y Everitt, 1980; Hafez, 1989; Chenoweth, 1997; Ortiz, 2000; Barrios, 2002). Durante ese proceso, en la célula espermática ocurren cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos (Johnson y Everitt, 1980; Chenoweth, 1997; Amann y Schanbacher, 1983). También ocurre la reabsorción e intercambio de fluidos (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997; Ortiz, 2000; Barrios, 2002). Específicamente, en la cabeza del epidídimo ocurre la reabsorción de solutos y fluidos, en el cuerpo del epidídimo la maduración espermática, y en la cola del epidídimo el almacenamiento de los espermatozoides fértiles (Amann y Schanbacher, 1983). Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo que tengan motilidad y capacidad de fertilizar, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser criopreservados para su posterior uso en inseminación artificial (I.A) (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997; Sheep Production Handbook, 2002; Ortiz, 2000; Barrios, 2002).

En su origen, los espermatozoides son incapaces de moverse, de allí que el transporte inicial a la rete testis depende del fluido secretado por las células de Sertoli. En los conductos eferentes, cabeza y cuerpo del epidídimo, el transporte es mediado por el epitelio del epidídimo, especialmente de las células ciliadas y contracciones peristálticas de la musculatura lisa de los conductos eferentes, la cabeza y cuerpo del epidídimo, más la presión hidrostática interna (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997; Ortiz, 2000; Barrios, 2002).

En el caso de la especie bovina, un solo epidídimo tiene capacidad para almacenar 4 ml de fluido rico en espermatozoides, con una concentración de 3.55×10^9 espermatozoides/ml, que ocupa la mitad de su volumen total (Amann, 1983; Hafez, 1989). Se han reportado resultados variables en las concentraciones espermáticas de los dos epidídimos de toros adultos, existiendo una concentración de 15 a 40×10^9 espermatozoides/ml, suficientes para proveer 20 eyaculados normales consecutivos en un periodo de 3 a 4 horas (Amann, 1983; Barrios, 2002).

El ambiente al que se enfrentan las células espermáticas cuando llegan al epidídimo es diferente al de los túbulos seminíferos y los conductos eferentes. Tal diferencia se debe a los cambios en la composición del fluido drenado por la rete testis, debido a que la presencia de la barrera hemotesticular es incompleta en esta región (Johnson y Everitt, 1980; Amann, 1987). Además, en todo el trayecto del epidídimo hay células secretoras cuyas secreciones afectan a los espermatozoides (Amann y Schanbacher, 1983).

A través de las contracciones peristálticas de la musculatura lisa que rodea el conducto epididimario y de la producción continua de fluidos, se establece el transporte espermático a lo largo de la cabeza y del cuerpo del epidídimo (Amann y Schanbacher, 1983). En la cola epididimaria, las contracciones son mucho menos frecuentes y el conducto está más tiempo inactivo. En consecuencia el tiempo requerido para que los espermatozoides se desplacen desde la cabeza y el cuerpo epididimario no está influenciado por la eyaculación y es similar para mamíferos comunes. En carneros, el tiempo de permanencia de los espermatozoides entre la cabeza y el cuerpo es de 2 a 3.5 días y de 8 a 13 días en la cola del epidídimo (Orgebin-Crist *et al*, 1975; Ortiz, 2000); en el toro, de 2 a 3 días en las dos primeras porciones del epidídimo y de 4 a 5 días en la última porción (Amann, 1988; Ortiz, 2000).

El almacenamiento que se desarrolla en la región caudal del epidídimo y se han descrito distintos factores que participan en la regulación de la misma. Por una parte, el mantenimiento de los espermatozoides en estado inmóvil en la cola epididimaria, depende de niveles de iones de hidrógeno (H^+) y de bicarbonato en esta región. En este sentido, el pH ácido (pH 6.5 a 6.8) del fluido epididimario y las bajas concentraciones de bicarbonato en el plasma epididimario caudal, junto al transportador de aniones en el espermatozoide, son caracterizados como algunos de los factores que regulan la movilidad de los espermatozoides epididimarios. Así la adición de bicarbonato a espermatozoides epididimarios de rata, ratón y verraco, produce una marcada e inmediata estimulación de su movilidad a través de actividad directa de la adenilciclasa, efecto incrementado por la

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem
incorporación de bloqueadores de canales de iones (Okamura, 1998; Reyes *et al.*, 2000, Setchell *et al.*, 1998).

Por otra lado, en el fluido epididimario están presentes distintas concentraciones de otros elementos como el sodio y el potasio, que también participan en la regulación de la movilidad de las células espermáticas. En este sentido se ha demostrado que la adición de cloruro de sodio a espermatozoides de la cola epididimaria de ratas, induce la movilidad de los mismos, mientras que la incubación en un medio libre de sodio no promueve el desarrollo de este parámetro espermático (Okamura, 1998). Por el contrario existen elevadas concentraciones de potasio en el fluido epididimario aunque no esté del todo clara la importancia que estos niveles tengan en la regulación de ciertas funciones de los espermatozoides del epidídimo (Setchell *et al.*, 1998). Así, mientras que el metabolismo y la movilidad de los espermatozoides epididimarios en toros son estimulados por concentraciones de potasio superiores a las fisiológicas (Amann y Schanbacher, 1983; Barrios, 2002).

2.4.1. *Maduración espermática*

La maduración espermática en el epidídimo es dependiente de las secreciones epiteliales, del transporte de sodio y potasio, de los andrógenos y de la temperatura escrotal (Amann y Schanbacher, 1983). Los cambios estructurales de los espermatozoides se deben a la utilización de fosfolípidos y colesterol como sustratos durante la maduración en el epidídimo. En estos cambios se completa el proceso de condensación nuclear, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática, aumentan la negatividad de la carga superficial, y ocurren ligeros cambios en la morfología del acrosoma (Johnson y Everitt, 1980; Ortiz, 2000).

La testosterona ejerce influencia directa en la maduración espermática. En el epidídimo los receptores intracelulares captan andrógenos y la enzima 5-alfa-reductasa convierte la testosterona en dihidrotestosterona (Brooks, 1983; Johnson y Everitt, 1980; Amann y Schanbacher, 1983). Si los andrógenos son removidos por castración, las secreciones cesan y el epidídimo involuciona. La inyección de testosterona restablece las secreciones (Johnson y Everitt, 1980; Ortiz, 2000; Barrios, 2002).

La maduración espermática incluye procesos tales como la adquisición de movilidad progresiva (Amann y Schanbacher, 1983), cambios morfológicos, metabólicos y en membranas espermáticas (Amann y Schanbacher, 1983; Hafez, 1989; Ortiz, 2000), así como la capacidad de unirse a la zona pelúcida y del poder fecundante (Amann y Schanbacher, 1983; Ortiz, 2000). Sin embargo, no se conoce de forma precisa en qué momento durante el tránsito espermático por el epidídimo, el espermatozoide adquiere estas propiedades. Aunque es posible que los espermatozoides de la región de la cabeza epididimaria aún no hayan adquirido alguna de estas funciones, otra posibilidad es que ya en dicha región la célula espermática haya conseguido alguna de ellas, aunque no es capaz de expresarlas (Graham, 1994). Los diferentes tipos de movimiento de los espermatozoides podemos clasificarlos con base al Cuadro 1 (Aisen *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Escala de vigor espermático de acuerdo a su movilidad (Tomada de Aisen *et al.*, 2002).

0	Espermatozoides inmóviles o muertos
1	Espermatozoides sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismos
2	Espermatozoides con movimiento anormal o eventualmente progresivo
3	Espermatozoides con movimiento progresivo lento y sinuoso
4	Espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido
5	Espermatozoides con movimiento progresivo enérgico

2.4.1.1 Adquisición de movilidad progresiva

Uno de los cambios más importantes del espermatozoide durante su maduración epididimaria, es el desarrollo de la capacidad de movimiento del mismo. Los espermatozoides testiculares a diferencia de los espermatozoides maduros aislados de la cola del epidídimo, presentan una movilidad muy baja o nula, incluso después de ser diluidos en solución salina fisiológica (Nakatsukasa, 2001). Esta incapacidad de los espermatozoides testiculares al movimiento puede deberse en cierta manera a la inmadurez de sus membranas plasmáticas, ya que los mismos pueden adquirir una movilidad parecida a los

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem
espermatozoides maduros de la cola epididimaria si previamente se separan sus membranas y se exponen a sustancias estimulantes de movimiento como el ATP, AMPc (Yanagimachi *et al.*, 1994; Nakatsukasa, 2001).

Los espermatozoides del carnero y verraco adquieren la capacidad de movimiento al momento que atraviesan el cuerpo del epidídimo, entre la región distal del mismo y la región proximal de la cola epididimaria (Amann *et al.*, 1982; Graham *et al.*, 1991); por otra parte el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva así como la velocidad de este parámetro aumenta significativamente entre la región medial del cuerpo y la distal de la cola epididimaria, siendo distinto el movimiento flagelar entre ambas regiones (Amann, 1988).

Algunas de las modificaciones de las características citoplasmáticas de los espermatozoides epididimarios se han relacionado con la inducción de la movilidad espermática. Estas modificaciones implican cambios en niveles intracelulares de AMPc (Amann, 1983), niveles de H⁺, la concentración de Ca²⁺, los niveles de bicarbonato, experimentando cambios importantes durante dicho proceso, habiéndose identificado cambios en su composición en la porción de la membrana que está en relación directa con el proceso de capacitación y reacción acrosómica, en función de la región epididimaria de procedencia de los espermatozoides (Amann *et al.*, 1988; Ortiz, 2000; Nakatsukasa, 2001).

De forma general en las especies animales, las proteínas presentes en el fluido epididimario participan tanto en el proceso de maduración espermática (promoviendo patrones de movimiento y unión a la zona pelúcida), como en la función de almacenamiento de los espermatozoides en la cola del epidídimo. Por otra parte las distintas proteínas de la membrana plasmática presentes en los espermatozoides de cada región epididimaria en función con el proceso de maduración, pueden participar en procesos de capacitación espermática, migración uterina del espermatozoide y reconocimiento, unión y fertilización del ovocito (Cooper, 1986).

2.4.1.2 Cambios metabólicos

Durante la maduración en el epidídimo, existen cambios significativos en el metabolismo espermático, existiendo diferencias notorias entre el metabolismo de los espermatozoides testiculares y epididimarios. Así el consumo de glucosa es 7 veces menor en espermatozoides testiculares de carnero, que los procedentes de la región caudal del epidídimo. Además los espermatozoides de la cola metabolizan más rápido la glucosa que los de la cabeza y el cuerpo de este órgano (Hammerstedt, 1993).

2.4.1.3 Cambios morfológicos.

En algunas especies, la morfología espermática y la estructura interna del acrosoma cambian durante la maduración epididimaria (Yanagimachi, 1994; Nakatsukasa, 2001). La morfología del núcleo epididimario no experimenta cambios drásticos durante este proceso de maduración, aunque en dicho proceso su cromatina se estabiliza por puentes disulfuros. También son estabilizados por este tipo de uniones los flagelos, lo cual podría conllevar a un movimiento más rígido del mismo permitiendo al espermatozoide maduro desplazarse de forma progresiva (Ortiz, 2000; Domínguez, 2010).

La gota citoplasmática (GC) y la migración de la misma desde una posición proximal a una distal de la pieza intermedia, es un factor indicativo de madurez espermática (Ortiz, 2000). La GC consiste en un remanente del citoplasma que queda en exceso, después de la transformación morfológica de la célula espermática durante la espermiogénesis.

En la mayoría de las especies animales, la GC cambia de posición distalmente a lo largo del flagelo durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo y se pierde durante la eyaculación (Curry y Watson, 1995; Fernández, 2006; Domínguez, 2010). Así, estudios realizados en espermatozoides epididimarios en carneros han demostrado que una alta proporción de gota citoplasmática es trasladada de la posición proximal a una distal con respecto a la pieza intermedia del espermatozoide, de la región de la cabeza del epidídimo antes de pasar a la región proximal del cuerpo del epidídimo (Amann *et al.*, 1982; Hammerstedt, 1993; Ortiz, 2000; Fernández, 2006). Por tanto, en regiones del cuerpo y cola epididimaria la gran mayoría de los espermatozoides presentan GC distal. Estos cambios

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem

morfológicos ocurridos durante la maduración del espermatozoide del carnero, son coincidentes con los observados en estudios realizados en espermatozoides de verraco (Briz *et al.*, 1995) y en ratones (Nakatsukasa, 2001).

La eliminación de la GC no es requisito previo para que se promueva la movilidad progresiva. La retención de la GC es normal y la misma no se pierde hasta que los espermatozoides se unen al plasma seminal durante la emisión y eyaculación del semen (Hammerstedt, 1982; Ortiz, 2000; Fernández, 2006; Domínguez, 2010).

La estabilidad cefálica de los espermatozoides, también cambia en función del proceso de maduración epididimaria. Así, los estudios realizados en espermatozoides de toros y verracos, indican que la incidencia de cabezas sueltas del eyaculado en condiciones no patológicas, está directamente relacionado con el tiempo en el que el espermatozoide ha estado almacenado en la cola del epidídimo (Ortiz, 2000; Fernández, 2006).

En un estudio realizado por Rodríguez *et al.* (2000) con toros mestizos (5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo), se encontró que el desarrollo y mantenimiento estructural y funcional de las células del epitelio en la cabeza del epidídimo, dependen de la función testicular y de los andrógenos testiculares, pero en la cola del epidídimo los mismos aspectos dependen de los andrógenos sanguíneos. También son estabilizados por este tipo de uniones los flagelos, lo cual podría conllevar a un movimiento más rígido del mismo, permitiendo al espermatozoide maduro desplazarse de forma progresiva (Bedford y Calvin, 1974).

2.5 Métodos de extracción de semen

El método ideal para la obtención de las muestras espermáticas no debe implicar riesgos físicos para los animales vivos ni para el personal encargado de realizar la extracción seminal. Además, el semen obtenido debe tener una composición química y física normal (Watson, 1978; Ortiz, 2000; Soler *et al.*, 2003).

Los métodos de recogida seminal usados en los carneros se dividen en dos grupos. En primer lugar se encuentran aquellos en los que el semen se recoge provocando o estimulando la eyaculación de los machos, incluyéndose en este grupo la obtención mediante vagina artificial (VA) y la electroeyaculación; y por otro lado, están aquellos en los que la muestra espermática se obtiene sin producirse la eyaculación de los machos, encontrándose dentro de estos la recuperación post-mortem de las células espermáticas procedentes del epidídimo (Kilian *et al.*, 2000; Gerber *et al.*, 2002).

2.5.1. Vagina artificial

El desarrollo de este método de recogida seminal se debe principalmente a los estudios llevados a cabo por investigadores polacos (Dott y Utsi, 1971; Krzywinski, 1976; Krzywinski y Jaczewski, 1978; Strzezek *et al.*, 1985). Los eyaculados recogidos mediante esta técnica son de gran calidad y no existen riesgos para los machos. Entre las desventajas de esta técnica, cabe destacar que los animales que se someten a este tipo de recogida seminal requieren un alto nivel de habituamiento y entrenamiento. Esta técnica de recogida seminal se reserva principalmente para animales que tienen un gran valor genético (Asher, 1998; Fernández, 2006; Domínguez, 2010).

2.5.2. Electroeyaculación

La mayoría de las recogidas de semen en cérvidos se realiza mediante electroeyaculación con los animales anestesiados (Asher *et al.*, 1993). El principal inconveniente de esta técnica es el riesgo que soportan los animales como consecuencia de la anestesia a la que se someten. Sin embargo, no precisa machos que estén entrenados pudiendo obtenerse semen de cualquier macho. Como una gran ventaja, es un método más seguro para los operarios.

Los eyaculados naturales se han considerado con una mejor calidad seminal que los obtenidos mediante electroeyaculación (Hafez C, 1989; Asher *et al.*, 2000; Barrios, 2000). Además, en el carnero se han obtenido mediante electroeyaculación muestras seminales con una calidad óptima (Anel *et al.*, 1999; Garde *et al.*, 1999b; Ortiz, 2000; Fernández, 2006; Domínguez, 2010).

2.5.3. Recogida epididimaria post-mortem

La obtención de las células espermáticas del epidídimo después de la muerte en los ovinos supone una gran ventaja desde un punto de vista conservacionista del material genético y productivo. Las células espermáticas almacenadas en este órgano son funcionalmente maduras y con la posibilidad de tener la misma capacidad fecundante que las que proceden del eyaculado (Robaire y Hermo, 1998; Cooper, 1999; Ortiz, 2000; Soler *et al.*, 2003).

El principal inconveniente de esta técnica es el número reducido de dosis espermáticas que se obtienen de los epidídimos. Así mismo, resulta imposible el estudio continuo de determinadas características sobre el mismo animal. La calidad seminal puede disminuir como consecuencia del tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la recogida de los espermatozoides (Soler *et al.*, 2003).

Estudios realizados en laboratorios se ha reportado que los espermatozoides y la capacidad fecundante de los espermatozoides obtenidos del epidídimo y conservados a temperatura ambiente disminuyen cuando los animales llevan muertos más de 12 horas (Garde *et al.*, 1998; Soler *et al.*, 2003); pero se ha demostrado que los espermatozoides obtenidos hasta 24 horas después de la muerte son capaces de penetrar in vitro ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (Garde *et al.*, 1996; Soler *et al.*, 2003). Por otra parte, con temperaturas más bajas la calidad seminal se conserva durante más tiempo (Friedmann *et al.*, 1999; Kaabi *et al.*, 1999; Kaabi *et al.*, 2003). En este sentido, se ha demostrado que los espermatozoides procedentes de testículos de ciervo ibérico conservados a 5°C, los espermatozoides evaluados mediante pruebas in vitro se mantienen hasta 4 días (Soler *et al.*, 2003).

2.6. Preservación de semen de ovino

Una variedad de técnicas de conservación de espermatozoides se han desarrollado para su utilización en diferentes especies. Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se hayan comparado diferentes diluyentes y métodos para preservar los espermatozoides de estas especies.

2.7. Diluyentes utilizados para la congelación de espermatozoides de ovinos.

Se ha encontrado que el problema de la baja fertilidad no se debe tanto al diluyente empleado, si no a la dificultad de paso de los espermatozoides y a la congelación, que puede ocasionar alteraciones en los espermatozoides (De Lucas y Arbiza, 2004). El semen eyaculado no sobrevive durante periodos largos, a menos que se hayan añadido varios agentes. Estos comprenden un buen diluyente que tiene las siguientes funciones: 1) proporcionar nutrientes como fuente de energía, 2) proteger contra los efectos dañinos del enfriamiento rápido, 3) proporcionar un medio amortiguador (buffer) para prevenir los cambios dañinos de pH tal como la formación de ácido láctico, 4) mantener la presión osmótica adecuada y el equilibrio electrolítico, 5) inhibir el crecimiento bacteriano, 6) aumentar el volumen del semen de tal manera que pueda utilizarse para I.A múltiple y 7) proteger las células espermáticas durante la congelación (Pickett y Berndtson, 1974; Foote, 1975; Graham, 1978; Berndtson y Pickett, 1978; Salisbury *et al.*, 1978).

La mayoría de los diluyentes de semen contienen Tris (Tri-hidroxi-metil-aminometano), yema de huevo y crioprotectores como el glicerol. Los concentrados de diluyentes comerciales (Onestep®, Biladyl®, Triladyl®) contienen crioprotectores que requieren de la adición de yema de huevo y agua de doble destilación. Estos diluyentes pueden usarse tanto para semen fresco como para su congelación (Cortés, 2003).

Los diluyentes para semen fresco y congelado son la leche entera de vaca, desnatada o reconstituida, calentada al baño-maría a 92-95 °C durante 8-10 minutos para inactivar cualquier factor tóxico, y la yema de huevo-glucosa-citrato (15% de yema de huevo, 0,8% de glucosa (anhídrica), 2,8% de citrato sódico dihidrato en agua destilada). La adición de Tris o glicerol mejora la supervivencia de los espermatozoides en el semen congelado-descongelado (Cortés, 2003). Los compuestos utilizados en la dilución del semen son múltiples, sin embargo los dos más conocidos y empleados son: 1) con base a la yema de huevo y 2) con base a la leche, generalmente descremada (De Lucas y Arbiza, 2004).

2.7.1 La leche como base del diluyente

El semen congelado de carnero en leche calentada, puede utilizarse exitosamente. Sin embargo, no es tan fértil como cuando se utiliza no diluido o no congelado a baja dilución. La mayoría del semen utilizado en países donde se practica la I.A en ovinos no se congela, aunque va en incremento. El semen de carnero es difícil de congelar satisfactoriamente, pero en la actualidad se ha desarrollado una gran variedad de diluyentes (Larsson, 1978).

La leche ha sido utilizada en Francia, debido a que el semen conserva buena capacidad de fertilización por un tiempo de 14 a 16 horas a 15°C, obteniéndose tasas de parición de entre 64 al 75% (De Lucas y Arbiza, 2004).

La leche descremada calentada, homogenizada o leche en polvo reconstituida, con glicerol de 7 a 10% incluido, se utiliza ampliamente. Se han llegado a adicionar enzimas tales como la amilasa y la β -glucuronidasa como fuente de energía, pero no se ha encontrado que mejore la fertilidad con su adición para la I.A en caprinos (Hafez, 1989).

Las recomendaciones que se realizan para la utilización de leche son: leche reconstituida, isotónica y descremada. También requiere sea calentada. A esta solución se le agregan antibióticos y otras sustancias (penicilina, estreptomycin y sulfonilamidas) en forma rutinaria.

La cantidad de leche descremada es de 10 gramos en 100 ml de agua o de 90 ml de agua y 10 ml de leche. Cuando la leche no está en polvo debe ser calentada por 10 minutos a 90-94°C, bajando posteriormente a 30°C, en este momento se le agrega 1 mg de sulfonilamida y 10 microgramos de catalasa por mililitro adicionado (De Lucas y Arbiza, 2004). Para la dilución de leche utilizando semen fresco se recomienda no enfriar la mezcla a menos de 15°C, ya que si se lleva a 4°C la mortalidad espermática es muy alta.

2.7.2. La yema de huevo como base del diluyente

En áreas de escasa refrigeración disponible, el semen puede almacenarse a temperatura ambiente. Un diluyente de yema de huevo carbonatada llamado diluyente Illinois de

temperatura variable (ITV), y la leche de coco da fertilidad satisfactoria cuando el semen se almacena hasta por unos pocos días a temperaturas ambiente moderadas (Hafez, 1985; Ferreira y Pérez, 2001). Los diluyentes de citrato-yema de huevo y tris-yema de huevo originalmente se desarrollaron para semen no congelado (De Lucas y Arbiza, 2004). Existen evidencias, principalmente en trabajos franceses, de que como diluyente este producto es menos efectivo que la leche descremada, tanto en semen utilizado en fresco como posdescongelado. La yema de huevo se emplea en una proporción que va del 3 al 20%, en compañía de una solución buffer de diferentes composiciones, azúcares y antibióticos.

El citrato de sodio puede ser sustituido por otra sal que se consideraba con mejores resultados el “Tris”, aunque en trabajos recientes se ha encontrado una superioridad clara sobre el citrato cuando el semen se mantiene a 5°C por dos días; incluso se ha observado mayor integridad de la membrana plasmática y su viabilidad es mejor en este último a los cuatro días de la dilución (López *et al.*, 1999).

2.8. *Criopreservación*

Cuando una solución es enfriada por debajo de su punto de congelación, es inicialmente sobre enfriada, es decir se mantiene líquida a una temperatura más baja que la del punto de equilibrio de su congelación. Esta situación es inestable y si la temperatura sigue disminuyendo es muy probable que se incrementen los fenómenos de nucleación y por lo tanto comiencen a formarse cristales de hielo (Watson y Fuller, 2001).

La nucleación se genera de forma espontánea y depende del volumen de la solución, del grado de sobre enfriamiento, de la concentración y la presencia de impurezas que puedan actuar como agentes nucleadores. Al aumentar la formación de cristales de hielo aumenta la concentración de solutos, ya que el agua pura cristalizada formando cristales de hielo y la solución que se mantiene líquida, cada vez es menor puesto que el núcleo de hielo va aumentando de tamaño. La osmolaridad registrada en esta solución líquida remanente puede llegar a ser incluso 20 veces más elevada cuando la temperatura se aproxima a –

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem
40°C (Mazur *et al.*, 1981). Bajo este rango de temperaturas la pequeña solución que quedaba líquida, finalmente se congela (Watson y Fuller, 2001).

Si la solución contiene células en suspensión se produce un intercambio de agua a través de la membrana plasmática entre el medio intra y extracelular. A una temperatura de -15°C , las células permanecen súper enfriadas a pesar de que el medio extracelular esté congelado debido a que la membrana plasmática impide el crecimiento de los cristales de hielo (Mazur, 1984). De este modo, el potencial químico del agua súper enfriada en el interior de la célula es mayor que la del agua que hay en el exterior de la misma y en respuesta a esta diferencia de potencial, el agua fluye fuera de la célula y se congela externamente.

2.8.1 *Criopreservación de espermatozoides a partir del epidídimo*

Las diferencias físicas en la forma y tamaño de los espermatozoides pueden influir en la susceptibilidad al daño osmótico durante el proceso de congelación-descongelación (Watson, 2000). El desarrollo funcional que se produce durante el tránsito dentro epidídimo implica cambios de membrana durante el cual el semen adquiere la capacidad de fertilizar (Hewitt *et al.*, 2001).

Cuando se pretende congelar y descongelar gametos del macho, es importante considerar las diferencias que existen entre los espermatozoides del eyaculado y los que son extraídos del epidídimo, tanto morfológico como funcional; tales diferencias, en el momento de la congelación, pueden influir en la estabilidad de la membrana frente al choque térmico y a la presión osmótica. Por lo tanto los métodos empleados para criopreservar espermatozoides eyaculados no son convenientes para ser usados con los espermatozoides obtenidos del epidídimo, a menos que sean añadidos componentes similares a los encontrados dentro del epidídimo, en la solución de congelamiento (Hewitt *et al.*, 2001).

En la actualidad pueden encontrarse múltiples alternativas para preservar los espermatozoides, dentro de los que se incluyen: congelación de células (gametos), de tejidos (epidídimo), la refrigeración de epidídimos obtenidos luego de la muerte y otras en las

que se pretenden simular las condiciones fisiológicas del epidídimo *in vitro*. Muchas investigaciones se han hecho especialmente con espermatozoides bovinos para entender la influencia de diferentes factores que limitan la vida de los gametos y diseñar un medio útil de conservación para mantener los espermatozoides vivos en un estado diferente al de congelación.

Hasta ahora ha sido muy difícil imitar las condiciones del epidídimo *in vitro* (pH bajo, altas concentraciones de células, baja tensión de oxígeno, etc.), aunque algunos reportes muestran que los espermatozoides pueden exhibir la capacidad de fertilizar después de ser almacenados por varios días en epidídimos refrigerados de diferentes especies. Desafortunadamente, ésta no es una alternativa práctica para almacenar espermatozoides (De Pauw *et al.*, 2003), tomando así la criopreservación y no la refrigeración como una forma viable de conservar el material genético.

Hay muchas variables que afectan la fertilidad y la supervivencia de los espermatozoides en mamíferos cuando son congelados, por lo tanto hay que considerar algunos factores esenciales para establecer el procedimiento de congelación (Brooke, 2000).

2.9. Intervalo entre la muerte, recolección y procesamiento del epidídimo

Dentro de los factores que determinan la viabilidad de los espermatozoides, el tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta la congelación de los gametos y el manejo que se da al epidídimo durante ese tiempo, van a ser unos de los factores más condicionantes para la supervivencia y capacidad fecundante de los espermatozoides en el futuro (Anel *et al.*, 2002).

La viabilidad de los espermatozoides depende del tratamiento dado al epidídimo. En ratones, el 30% de los espermatozoides conservan su motilidad cuando son mantenidos a 4°C por 10 días, considerando que la motilidad decrece de 10 a 15% en las 24 horas siguientes a la muerte en cadáveres que son conservados a temperatura ambiente.

El ciervo (*Cervus nippon*) ha sido usado como un modelo potencialmente bueno para aplicar estas técnicas asistidas de reproducción con el fin de evitar que siga en peligro de extinguirse. En el ciervo, los espermatozoides han sido recuperados y usados para la criopreservación y posterior I.A y fertilización in vitro. Sin embargo, la información sobre el almacenamiento de los epidídimos es limitada. Aún no ha sido reportada ninguna investigación sobre la criopreservación de espermatozoides de ciervo colectados de epidídimos refrigerados por varios días (Hishinuma *et al.*, 2003).

En ratones se han producido fertilizaciones in vitro (FIV) de oocitos con espermatozoides tomados en la cola del epidídimo de cadáveres que fueron conservados en un cuarto a temperatura fija por 24 horas. También en ratones han sido recuperados del epidídimo gametos viables después de haberse refrigerado por 7 días post-mortem; anteriormente fueron producidos embriones jóvenes derivados de la FIV.

Usando la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, Kishikawa *et al.* (2001), produjeron fetos normales de ratón usando espermatozoides recuperados después de 20 días de la muerte del ratón. Marks *et al.* (1989) recuperaron y congelaron espermatozoides a partir de los testículos de un perro que fue sometido a eutanasia a causa de una enfermedad generalizada con daños progresivos. Cuando descongelaron los espermatozoides e inseminaron una hembra sana, nació un cachorro normal.

Estos estudios muestran que los espermatozoides recuperados de especies luego de su muerte, incluso muchas horas después, mantienen su función normal (Yu *et al.*, 2002). Los espermatozoides del epidídimo con una motilidad de 70 a 90% pueden ser obtenidos varias horas después, siempre y cuando los órganos sean refrigerados inmediatamente (Gerber *et al.*, 2002).

Según Anel *et al.* (2002), dependiendo del intervalo entre la recuperación de los espermatozoides y la muerte, la motilidad espermática disminuirá significativamente entre las 24 y 48 horas. Después de las 48 horas post-mortem, todas las medidas de calidad de los

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem

espermatozoides declinan progresivamente. Este autor, sugiere que el tejido del epidídimo debe refrigerarse antes de las 48 horas después de la muerte con el fin de asegurar una mayor probabilidad de vida de los espermatozoides.

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante establecer protocolo(s) que permitan recolectar espermatozoides de ovinos élites que hayan muerto repentinamente por diversos eventos (causas) fuera del control directo de los productores, a manera que exista la posibilidad de obtener descendencia de reproductores mediante la I.A, transferencia de embriones (T.E), fertilización in vitro (FIV) u otras técnicas de biotecnología reproductiva asistida conocidas. Por ello, podría implementarse técnicas confiables para la recolección de espermatozoides como alternativas por lavado o corte sagital de la cola del epidídimo, proveniente de testículos de machos ovinos post-mortem.

La obtención de espermatozoides a partir de estas técnicas en machos ovinos post mortem (preferentemente antes de 12 hrs), son una alternativa viable de inicio para aquellas unidades de producción de pie de cría que cuentan con ejemplares de alto valor genético y económico.

4. HIPÓTESIS

La recolección de espermatozoides obtenidos a partir de las técnicas de lavado y corte sagital de la cola del epidídimo en machos ovinos post-mortem, permite su criopreservación con posibilidad inicial para ser aplicado en técnicas de biotecnología reproductiva asistida en ovinos y por consiguiente la propagación de material de alto valor genético.

5. OBJETIVO GENERAL

- Comparar y evaluar la recuperación de espermatozoides en epidídimo a través de dos técnicas: lavado caudal y corte sagital de la cola del epidídimo en machos ovinos post mortem dentro de las primeras 12 horas, que incluya la recolección, evaluación de características macro y microscópicas, dilución, refrigeración, congelación, descongelación y su re-evaluación.

5.1 Objetivos específicos

- Comparar dos técnicas de recolección de espermatozoides a partir de la cola del epidídimo.
- Evaluar la calidad de los espermatozoides según los parámetros de motilidad en masa e individual, concentración y porcentaje de espermatozoides vivos *pre* y *post* descongelación.
- Establecer protocolo(s) de congelación que mantenga la viabilidad de los espermatozoides.
- Establecer un protocolo post-congelación que mantenga la viabilidad de los espermatozoides.
- Evaluar el lapso del tiempo transcurrido entre la recolección de los testículos en el rastro y la calidad de los espermatozoides recolectados del epidídimo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Para la obtención de los espermatozoides a partir de los epidídimos, se utilizaron un total de 28 muestras de testículos de machos ovinos (divididos en dos grupos de 14 c/u de forma aleatoria, un par de epidídimos para los dos métodos) de las razas Rambouillet, Pelibuey, Hampshire, Katahdin, Suffolk y Dorper, obtenidos del rastro municipal de Capulhuac, Estado de México (Figura 3). El cuadro 3 muestra el periodo, razas de los ovinos así como el número de muestras procesadas para métodos de recolección de espermatozoides. Las muestras se obtuvieron de animales con una edad entre 1 a 3 años. La condición corporal que presentaron previa obtención de las muestras fue de 3.4 en promedio (de acuerdo a Manazza, 2006). La hora promedio de la obtención de las muestras fue a las 5:30 am. y el tiempo promedio al inicio del procesamiento en ambos métodos fue de 4:30 horas después de la toma de las muestras (10:00 am).



Figura 3. Canales ovinas, rastro de Capulhuac, Estado de México.

Cuadro 2. Muestras de epidídimos procesados por mes, por método y obtenidas por raza.

Mes	Método			Raza					
	No. muestras	Lavado Epidídimo	Corte sagital	Rambouillet	Pelibuey	Hampshire	Katahdin	Suffolk	Dorper
Agosto	4	2	2	2	2				
Septiembre	4	2	2		2	2			
Octubre	8	4	4		4		2	2	
Enero	4	2	2				2		2
Febrero	8	4	4			6			2
Total	28	14	14	2	8	8	4	2	4

6.2. Material y método de campo (rastros)

Para la obtención de los testículos, primero se realizó el ligamiento del paquete espermático; los órganos fueron separados del cuerpo de los animales realizando una incisión a nivel inguinal; los testículos se introdujeron en bolsas estériles (Figura 4) e introducidos a la hielera, recubiertos con una manta (aislante) en la parte inferior evitando el contacto directo con el hielo, manteniendo los testículos durante su transporte en refrigeración entre 4 a 5°C.



Figura 4. Testículos de ovinos en bolsas estériles

El material de campo empleado para la recolección y traslado de los testículos ovinos fueron:

- Hielera
- Manta
- Hilo
- Cuchillo
- Bolsas de plástico estériles
- Botas
- Bata
- Guantes
- Cubre bocas
- Libreta de registro
- Reloj

6.3 Método en laboratorio

Los órganos fueron ingresados al laboratorio No. 4 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma del Estado de México (Figura 5), registrando el tiempo transcurrido de su recolección a la hora de inicio de su manejo, así como del inicio del procesamiento (4:30 horas promedio después de su muestreo).



Figura 5. Mesa de trabajo con material para el procesamiento de muestras en el laboratorio 4 de la FMVZ-UAEMéx.

En el procesado de las muestras dentro del laboratorio (Figuras 6 y 7), fue empleado el siguiente material:

- Papel de estraza
- Gasas
- Charola de disección
- Estuche de disecciones
- Bisturí
- Aguja del 23
- Jeringa de 60 ml
- Cajas de Petri
- Pipetas Pasteur
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio con objetivos 5x,10x, 25x y 40x (modelo Labomed Lx500 con cámara digital high resolution).
- Mechero de Bunsen
- Tubos graduados de 15 ml
- Tubos corning
- Diluyente preparado base Triladyl-agua tridestilada-yema de huevo
- Tinción eosina-nigrosina
- Cámara de Neubauer
- Solución de Hayen
- Pipeta cuenta glóbulos
- Contador de células
- Libreta de registro
- Frasco de 250 ml c/algodón comprimido
- Refrigerador (5°C)
- Pajillas de 0.25 ml
- Jeringa de 3 ml

- Alcohol polivinílico
- Vaso de precipitado de 500 ml c/agua destilada
- Toallas desechables
- Recipiente (caja) de unicel c/nitrógeno líquido
- Frascos con algodón comprimido
- Rejilla
- Reloj
- Pinzas



Figuras 6 y 7. Material empleado para la recolección de espermatozoides por corte sagital y lavado epididimal

6.4. Lavado caudal de la cola del epidídimo y corte sagital

Este método se realizó extrayendo el testículo de la hielera retirando el tejido subcutáneo, la fascia espermática externa, la cremastérica interna, la túnica vaginal y la túnica albugínea, posibilitando descubrir el conducto deferente del paquete espermático. Fue insertado en la luz del conducto deferente una aguja de calibre 23, la cual es fijada con pinzas de hemostásis (Figura 8 y 9).

Utilizando una jeringa de 50 ml que previamente se encuentra cargada de aire fue insertada a la aguja. Posteriormente, con el bisturí se realizó una incisión (1 cm) en la cola del epidídimo en la parte más proximal al testículo y colocándolo al mismo del mismo dentro de la caja de petri, provista con 1 ml de diluyente base a una temperatura de 4°C (TriladyI-agua

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem tridestilada-yema de huevo), procediendo a ejercer presión de la jeringa provocando el flujo retrógrado del material espermático, favoreciendo con ello como resultado su depósito en la caja de petri (Figura 10, 11 y 12).



Figura 8 y 9. Retiro de las capas que recubren a las mismas e insertado en la luz del conducto deferente una aguja de calibre 23



Figura 10, 11 y 12. Jeringa previamente cargada con aire e insertada, realización de la incisión y colocación de la cola del epidídimo dentro de la caja de petri.

A diferencia del lavado caudal del epidídimo, para la obtención de los espermatozoides mediante el corte sagital de la cola de epidídimo, éstos fueron separados de los testículos con ayuda de pinzas de hemostásis y unas tijeras curvas. Sobre una placa petri conteniendo el diluyente base, se realizan cortes de manera sagital en la cola del epidídimo (2.0 cm), seguidos de cortes transversos (2.0 cm). Finalmente mediante el uso de una pipeta Pasteur son lavados con el diluyente recuperando los espermatozoides dentro de la caja de petri (Figuras 13 y 14).



Figuras13 y 14. Separación de la cola del epidídimo del testículo y lavado con el diluyente para recuperación los espermatozoides dentro de la caja de petri.

Con ambos métodos, se obtuvieron dos muestras de material espermático (Figura 15) sin diluir para evaluar la motilidad en masa de acuerdo a Aisen y Venturino (2004), sobre el movimiento en masa una escala de 0 (acinesis) y 5 (movimiento muy rápido); asimismo, la motilidad individual, concentración espermática y su tinción con eosina-nigrosina para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos (integridad y funcionalidad de la membrana plasmática).

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem



Figura 15. Muestras de germoplasma para evaluación sobre motilidad.

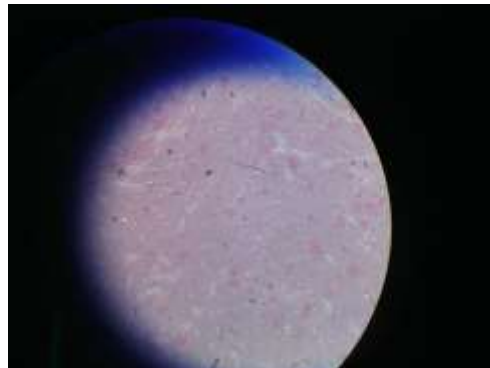
La concentración espermática se determinó usando un hemocitómetro (cámara de Neubauer) observándose al microscopio para el conteo de células con apoyo del contador de células (Figuras 17 y 18).



Figuras 17 y 18. Cámara de Neubauer y determinación de la concentración de espermatozoides.

La tinción de las células espermáticas se realizó utilizando eosina y nigrosina, mezclando 5 μ l de solución de espermatozoides con 10 μ l de tinción en un portaobjetos a 32°C., se procedió a realizar un frotis dejando secar por 30 segundos. Observando al microscopio (objetivo 40x), se contaron 100 células en un campo y a su vez se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos, que fueron aquellos que aparecen teñidos en el contorno,

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem
presentando por lo tanto su membrana celular integra (Figuras 19 y 20). Por lo contrario, aquellas que no tenían la membrana integra fueron incapaces de excluir la tinción apareciendo teñidas de color rosáceo y considerándose como células muertas.



Figuras 19 y 20. Frotis de espermatozoides con tinción eosina–nigrosina y observación de espermatozoides al microscopio

Los espermatozoides fueron suspendidos en 1ml de diluyente para la criopreservación, añadiendo el diluyente final, posteriormente al análisis microscópico (% de células vivas y concentración). Continuando con el protocolo, se trasvasó la suspensión del material espermático diluido a un tubo colector graduado (Figuras 21 y 22). Una vez calculada la concentración espermática y determinado el porcentaje de espermatozoides vivos, se diluyó completamente la muestra obtenida alcanzando alrededor de 500 millones de células por ml.



Figura 21 y 22. Espermatozoides diluidos en la caja de petri y adición del diluyente al germoplasma en tubo colector.

El diluyente fue mezclado con la suspensión espermática en un solo paso, integrándose a la muestra a modo que al empajillado quedasen a una concentración de 35 millones de espermatozoides vivos.

6.4.1 Refrigeración de los espermatozoides diluidos.

El tubo colector con espermatozoides diluidos fue introducido a un frasco hermético provisto de algodón comprimido (Figuras 23 y 24) provocando que el enfriamiento fuera gradual (para evitar el choque térmico) el cual fue introducido a refrigeración. El proceso de enfriamiento para alcanzar 5°C es de aproximadamente de 0.26°C/min, permaneciendo al menos por dos horas en refrigeración.



Figuras 23 y 24. Tubo colector con espermatozoides diluidos y frascos herméticos provistos de algodón comprimido, para la refrigeración de las muestras.

Transcurrido el tiempo de refrigeración de las muestras, fueron envasadas en pajillas de 0.25ml (dentro del refrigerador). En un vaso de precipitado de 1000ml conteniendo agua destilada a 5°C (refrigerada), fueron introducidas las pajillas selladas con alcohol polivinílico por un periodo de 20 minutos para su estabilización (Figuras 25 y 26). Transcurrido este tiempo, fueron secadas y trasladadas a un recipiente provisto de nitrógeno líquido, que

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem

contenía una rejilla para descansar las pajillas horizontalmente a 5 cm sobre el nivel superior del nitrógeno líquido, exponiéndose a baños o vapores de nitrógeno durante 20 minutos, para alcanzar al término de este tiempo -96°C . Posteriormente fueron sumergidas las pajillas al nitrógeno líquido, alcanzando aquí una temperatura de -196°C , culminando el proceso de congelación (Figuras 27 y 28).



Figuras 25 y 26. Envasado en pajillas de 0.25ml y estabilización.

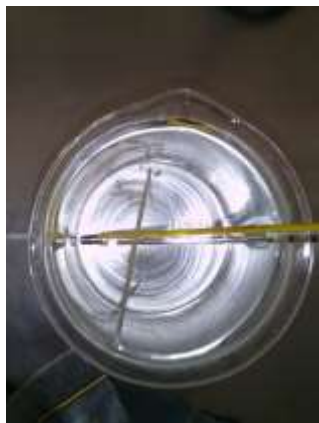


Figuras 27 y 28. Baños de nitrógeno y congelación de las pajillas.

6.4.2 Descongelación de pajillas y evaluación de supervivencia de espermatozoides

Para la descongelación de las pajillas se utilizó un baño María a una temperatura de 50°C . La pajilla fue sumergida durante 50 segundos, seguida del secado con toallas desechables; posteriormente fue cortado el extremo del sellado, colocando una gota de espermatozoides

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem diluídos en el portaobjetos a una temperatura de 32°C, realizando la evaluación de rutina mencionada anteriormente previa a su congelación (Figuras 29 y 30).



Figuras 29 y 30. Descongelación de pajillas en baño María y posterior evaluación de parámetros cualitativos.

6.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de la totalidad de muestras utilizadas. Para el comparativo de ambos los protocolos (corte sagital vs lavado caudal del epidídimo), se realizó un análisis de comparación de medias mínimo cuadráticas bajo un modelo de efectos fijos para las variables macro y microscópicas (volumen, motilidad en masa y progresiva, % de espermatozoides vivos y muertos, concentración espermática, y a la descongelación las variables motilidad en masa y % de espermatozoides vivos y muertos).

El modelo de efectos fijos incluyó:

$$y_{ijklm} = \mu + Ra_i + Ed_j + Cc_k + Mt_l + m_m + e_{ijklm}$$

en donde:

y_{ijklm} = variables macro y microscópicas

μ = Media general

Ra_i = Efecto del *i*ésimo nivel de la raza del ovino, (n=6)

Ed_j = Efecto del *j*ésimo nivel de la edad del ovino, (n=6)

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem

CC_k = Efecto de késimo nivel de la condición corporal, (n=3)

Mt_i = Efecto del iésimo nivel del método de procesamiento, (n=2)

m_m = Efecto del mésimo nivel del mes de procesamiento, (n=5)

e_{ijkl} = error aleatorio

Los análisis estadísticos se estimaron con el uso del programa estadístico JMP®from SAS (versión 8.0, 2008).

7. LÍMITE DE ESPACIO.

El estudio experimental se llevó a cabo utilizando testículos de ovinos post mortem obtenidos del rastro municipal de Capulhuac, Estado de México. El procesamiento de los órganos se realizó en los laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca de Lerdo, Estado de México, que se encuentra ubicado entre las coordenadas 19° 24' latitud Norte y 99° 40' longitud Oeste del Meridiano de Greenwich a una Altitud de 2638 m.s.n.m., predominando el clima templado húmedo. Presenta una temperatura con un rango en el mes más frío de -3 y de 18° C y en el mes más cálido, con una media anual entre 12 y 18° C. Las lluvias se distribuyen en primavera y verano con una precipitación pluvial anual entre los 800 y 1000 mm. Presentando heladas en un periodo de 80 a 140 días en la época fría (Enciclopedia de los Municipios de México, 2005; INEGI 2003).

8. LÍMITE DE TIEMPO

Este estudio se realizó durante el periodo comprendido entre los meses de mayo de 2014 al mes de abril de 2015, considerando las siguientes fases:

Fase 1: Revisión de los antecedentes bibliográficos. Enero a abril de 2014.

Fase 2: Pruebas del montaje de los protocolos de lavado caudal y corte sagital de la cola del epidídimo (enero –marzo de 2014). Evaluación de la calidad de las muestras (macro y microscópicas). Abril y mayo de 2014.

Fase 3: Aceptación de Protocolo. Octubre de 2014.

Fase 4: Pruebas del montaje del protocolo de congelación de espermatozoides. (Evaluación de la calidad de las muestras (microscópicas) y descongelación. Julio de 2014.

Fase 5: Procesamiento de muestras, evaluación, congelación y descongelación para ambos protocolos de lavado caudal y corte sagital de la cola del epidídimo. Agosto de 2014 a febrero de 2015.

Fase 5: Obtención de resultados descriptivos y análisis estadísticos. Febrero de 2015.

Fase 6: Redacción de resultados, discusión y conclusiones. Marzo a junio de 2015.

9. RESULTADOS

Los resultados de este estudio indicaron que los valores promedio obtenidos de las muestras de los epidídimos fueron para el volumen: $0.59 \text{ ml} \pm 0.3$, motilidad en masa: $3.05 \text{ ml} \pm 0.62$, motilidad progresiva: $70.9\% \pm 17.4$, espermatozoides vivos: $73.2\% \pm 18.4$ y con una concentración espermática: $2,836.15 \times 10^7 \pm 2,799.26 \times 10^7$. Asimismo, se encontraron valores promedio inferiores al descongelamiento, disminuyendo la motilidad en masa en un 4% y un 8.75% de espermatozoides vivos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen de las características macro y microscópicas antes y después de la congelación del germoplasma obtenido por lavado y corte sagital del epidídimo en testículos de ovinos.

Concepto	Antes de la congelación				Después de la congelación			
	Promedio	DS	Máximo	Mínimo	Promedio	DS	Máximo	Mínimo
Volumen de la muestra (ml)	0.59	0.3	1.5	0.2				
Motilidad en masa	3.05	0.62	4	2	2.93	0.59	3.5	1
Motilidad progresiva (%)	70.9	17.48	95	40				
Espermatozoides vivos (%)	73.2	18.42	90	30	66.8	17.11	85	30
Concentración espermática ($\times 10^7$)	2,836.15	2,799.26	9,557.00	103.00				

En el presente estudio se encontró que la comparación de los métodos de recolección de espermatozoides epididimarios (corte sagital vs lavado caudal del epidídimo) no se encontraron diferencias significativas para todas las variables analizadas (volumen, motilidad en masa y progresiva, espermatozoides vivos), tanto para la evaluación previa a la congelación y posterior a la descongelación ($P > 0.05$).

Los efectos de la raza, condición corporal y el mes de procesamiento de las muestras tuvieron efectos significativos ($P < 0.05$) sobre las variables del volumen de la muestra, motilidad en masa y progresiva, así como del % de espermatozoides vivos; en tanto que estos efectos no fueron significativos sobre la concentración espermática ($P > 0.05$), como se observa en el Cuadro 4. Con respecto a la edad del ovino y el método de procesamiento, no se encontraron diferencias significativas sobre las características macro y microscópicas en ambos métodos ($P > 0.05$).

En el caso de la descongelación, los efectos de la raza, edad y mes de procesado se encontró que fueron significativos para las variable de motilidad en masa ($P < 0.05$), en tanto que en el método de procesado, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). Para el porcentaje de espermatozoides vivos, todos los efectos analizados tuvieron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efectos de raza, edad, condición corporal del ovino, el mes de recolección y método de procesamiento (lavado y corte sagital del epidídimo) sobre las características macro y microscópicas antes y después de la congelación del germoplasma.

Efecto	Antes de la congelación					Después de la congelación				
	Raza	Mes	Edad	C.C.	Método	Raza	Mes	Edad	C.C.	Método
Volumen de la muestra (ml)	0.001	0.003	0.334	0.043	0.356					
Motilidad en masa	0.001	0.001	0.899	0.001	0.759	0.004	0.011	0.024	0.441	0.316
Motilidad progresiva (%)	0.001	0.013	0.124	0.024	0.240					
Espermatozoides vivos (%)	0.001	0.001	0.070	0.114	0.838	0.001	0.001	0.004	0.020	0.005
Concentración espermática ($\times 10^7$)	0.223	0.692	0.274	0.895	0.607					

Para el efecto del mes de procesamiento, se observó que en el mes de enero existió mayor volumen de la muestra ($1.35 \text{ ml} \pm 0.25$, $P < 0.05$) con respecto a los demás meses que se procesaron muestras (Cuadro 5), siendo que en estos meses (agosto, septiembre, octubre y febrero) no existiendo diferencias significativas entre ellas ($P > 0.05$).

Para la motilidad en masa, los ovinos Suffolk tuvieron mayor motilidad (3.83 ± 0.38) respecto a las diferentes razas ($P < 0.05$). Los machos Hampshire y Dorper no se encontraron diferencias ($P > 0.05$), teniendo 20.8% mayor motilidad comparados con ovinos Pelibuey ($P < 0.05$). En contraste, las muestras de los machos Katahdin hubo menor motilidad en masa (38.5%) que el promedio de las razas ($P < 0.05$), como puede observarse en el Cuadro 5.

La motilidad en masa de acuerdo al mes de muestreo, se observó que en septiembre tuvo mayor motilidad con respecto a los demás meses de muestreo ($P < 0.05$), en tanto que en

Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en ovinos post mortem

octubre fue el mes en que las muestras tuvieron el menor registro de motilidad en masa (40.8% menos que en septiembre) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Medias mínimo cuadráticas de las variables de volumen, motilidad en masa y progresiva y % de espermatozoides vivos tras el proceso de congelación – descongelación^D de las muestras, por efectos de la raza y mes de procesamiento

Efecto		Motilidad				Motilidad	
Raza	N	Volumen (ml)	en masa	Progresiva	% vivos	en masa ^D	% vivos ^D
Rambouillet	2	1.101±0.229 ^{ab}	2.879±0.436 ^{abc}	85.15±10.04 ^{ab}	77.57±2.55 ^{ab}	2.080±0.556 ^b	69.00±4.539 ^b
Pelibuey	8	0.501±0.530 ^{bc}	2.879±0.158 ^{bc}	77.65±3.630 ^b	60.94±4.970 ^b	2.747±0.227 ^b	54.00±1.851 ^{bc}
Hampshire	8	0.801±0.102 ^{ab}	3.229±0.194 ^{ab}	77.76±4.464 ^b	86.94±4.730 ^a	2.847±0.214 ^b	99.00±1.745 ^a
Katahdin	4	0.421±0.147 ^{bc}	1.879±0.280 ^c	43.98±6.447 ^c	61.87±7.670 ^b	1.647±0.404 ^b	32.33±3.297 ^d
Suffolk	2	1.311±0.199 ^a	3.829±0.378 ^a	90.48±8.698 ^a	77.4±7.032 ^{ab}	3.030±0.387 ^a	92.33±3.173 ^a
Dorper	4	0.211±0.107 ^c	3.229±0.204 ^{ab}	57.48±4.704 ^{bc}	68.37±4.890 ^b	2.530±0.206 ^b	49.83±1.682 ^c
Valor de P		0.001	0.001	0.001	0.001	0.004	0.001
Mes							
Agosto	4	0.143±0.164 ^b	2.553±0.312 ^{ab}	55.25±7.180 ^b	73.82±9.223 ^b	2.552±0.454 ^{abc}	63.75±3.704 ^b
Septiembre	4	0.568±0.143 ^b	3.804±0.271 ^a	60.67±6.254 ^b	72.44±7.912 ^b	1.927±0.369 ^{bc}	62.42±3.015 ^b
Octubre	8	0.373±0.096 ^b	2.454±0.183 ^b	58.92±4.217 ^b	81.24±4.510 ^b	1.652±0.248 ^c	56.42±2.027 ^c
Enero	4	1.353±0.251 ^a	3.204±0.480 ^{ab}	90.43±11.00 ^a	85.27±5.540 ^a	3.252±0.517 ^a	78.93±4.224 ^a
Febrero	8	0.783±0.108 ^b	3.054±0.206 ^{ab}	80.42±4.735 ^{ab}	78.13±4.886 ^b	3.018±0.219 ^b	66.92±1.787 ^{ab}
Valor de P		0.003	0.001	0.013	0.001	0.011	0.001

*^D= descongelación

Para la motilidad progresiva, las muestras de los machos Suffolk tuvieron una diferencia altamente significativa (Cuadro 5) con relación a las diversas razas utilizadas en este estudio ($P > 0.05$), por ejemplo un 12.3% más que el ovino Rambouillet, 20.5% más que los ovinos Pelibuey y Hampshire y 40% más que ovinos Dorper; en tanto que con los ovinos Katahdin existió una gran diferencia con respecto a los ovinos Suffolk (53.5% menos, $P < 0.05$).

De acuerdo al mes de recuperación de espermatozoides, la motilidad progresiva se observó que en enero existió un mayor porcentaje (47.5% más que los meses de agosto, septiembre y octubre, y 27.5% más que en el mes de febrero). En los ovinos Hampshire no se encontró

un efecto sobre el porcentaje de espermatozoides vivos en el mes de recuperación, ya que los valores no fueron significativamente diferentes entre la muestra obtenida en este estudio ($86.9\% \pm 4.73$).

La significancia de acuerdo al mes de muestreo y el porcentaje de espermatozoides vivos fue mayor para el mes de enero a diferencia de los demás meses ($P > 0.05$). Siendo 57.6% mayor en enero y con un 73.2 ± 18.42 en promedio clasificados como morfológicamente normales.

A la evaluación de la motilidad en masa después de la congelación los ovinos Suffolk obtuvieron 3.03 ± 0.39 en comparación con las demás razas presentando mejores parámetros de motilidad; los ovinos Hampshire tuvieron 19.4% menor motilidad en masa post descongelación que los ovinos Suffolk y los mejores resultados fueron en el mes de enero con una motilidad de 3.25 ± 0.52 (cuadro 5) y una motilidad en masa post descongelación en promedio de 2.93 ± 0.59 , valores mayores a Soler (2003) en ciervo ibérico con 2.7.

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que la comparación de los métodos de recolección de espermatozoides epididimarios (corte sagital vs lavado caudal del epidídimo) no se encontraron diferencias significativas para todas las variables analizadas (volumen, motilidad en masa y progresiva, espermatozoides vivos), tanto para la evaluación previa a la congelación y posterior a la descongelación ($P > 0.05$). Con este resultado encontrado, podemos indicar que independientemente del método aplicado en la recolección de espermatozoides en la especie ovina para su posterior congelación, ambos procedimientos son viables y efectivos para ser considerados dentro de las técnicas de biotecnología reproductiva asistida.

De acuerdo al desarrollo del método empleado, se puede citar que existe ciertas ventajas en el manejo de las muestras recuperadas con la técnica del lavado caudal de la cola del epidídimo contra la técnica de corte sagital, debido a que ésta última se llega a contaminar de eritrocitos y partículas pequeñas de tejido (parénquima) del epidídimo. En ambas técnicas el tiempo de procesamiento es similar, siendo un recurso eficiente para la preservación de espermatozoides epididimarios en ovinos post mortem.

Algunos de los autores con diferentes especies han comprobado que varios parámetros de la motilidad se alteran tan pronto transcurren unas pocas horas desde la muerte del animal (Soler 2003; Kabbi *et al.* 2003; Hishinuma *et al.* 2003). En el caso de ciervo ibérico, Garde *et al.* (1998) reportaron que el tiempo transcurrido entre la muerte del venado y la recogida de la muestra epididimaria influía en la calidad de las mismas.

De León (2008), comparó semen de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) obtenido mediante electroeyaculación vs corte y lavado del epidídimo ($89.6\% \pm 3.06$ vs $85.9\% \pm 2.94$) ($P < 0.05$). Al igual que Peña en el ciervo ibérico obtuvo un 89.4% de espermatozoides vivos a la recuperación espermática post mortem.

De acuerdo a la raza, se observó que las muestras de los machos Suffolk tuvieron mayor volumen 1.311 ± 0.199 que demás razas ($P < 0.05$). Asimismo, las muestras de los machos Rambouillet y Hampshire tuvieron 52.6% más volumen que las muestras de los machos de raza Pelibuey y Katahdin ($P < 0.05$); en tanto que las muestras de los machos de raza Dorper fueron los que tuvieron menor cantidad de volumen comparados con las demás razas (Cuadro 5). Un estudio realizado en España (Peña, 2013) con ciervos ibéricos, indicó que el volumen fue de $1.30 \text{ ml} \pm 0.3$, resultado que es semejante a los valores del volumen reportado en ovinos con este estudio. En este estudio los machos ovinos tuvieron una media de 0.59 ml , un valor máximo de 1.5 ml y un mínimo de 0.2 ml . En camélidos sudamericanos como la alpaca (Banda *et al.*, 2010), encontraron un volumen promedio de 1.0 ml por muestra; mientras que Muñoz (2008) en la especie "*Pudu pudu*" obtuvieron valores muy similares $0.77 \text{ ml} \pm 0.32$ promedio.

Para el tiempo posterior a la recuperación de espermatozoides, Banda (2010), encontró resultados menores obtenidos de alpaca $34.5\% \pm 3.0$; el deterioro de los parámetros espermáticos coincide con observaciones en otras especies (Garde *et al.*, 1994; Anel *et al.*, 2002; Tittarelli *et al.*, 2006), donde se demuestra que la integridad de la membrana plasmática y el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, disminuye significativamente entre las 24 y 48 horas post mortem, siendo bajas todas las medidas de calidad espermática luego de las 48 horas. En nuestro estudio no fueron analizadas las variables con respecto al tiempo de posterior del procesamiento de las muestras.

Para el efecto del mes de procesamiento, se observó que en el mes de enero existió mayor volumen de la muestra ($P < 0.05$) con respecto a los demás meses que se procesaron muestras. No existen en nuestro conocimiento información sobre diferencias en especies sobre el volumen de la muestra referente al mes de su procesamiento.

Para la motilidad en masa, en nuestro estudio se encontró que existieron diferencias entre razas. En este sentido, Ribeiro-Peres (2014) mencionan que los espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo tuvieron una motilidad en masa promedio de 3.5; en tanto

que Muñoz (2008) en espermatozoides obtenidos de la especie *Pudu pudu*, registraron una motilidad en masa de 3.2. Garde *et al.* (1998) encontraron una motilidad en masa en ciervo ibérico, catalogados en 2 grupos de (AC) alta calidad 3.8 ± 0.1 y (BC) baja calidad 2.4 ± 0.1 . También Soler (2003) en esta especie observó 2.8 el movimiento en masa. Los parámetros de las especies antes citadas, reportaron rangos que coinciden con lo encontrado en nuestro estudio.

Las diferencias señaladas en nuestro estudio, podrían obedecer a dos razones, una basada a los diferentes meses de recogida de las muestras, puesto que Malo *et al.* (2005) y Peña (2013) en ciervos ibéricos al igual que en este trabajo, las muestras se recogieron durante toda la época reproductiva cuando los indicadores de motilidad fueron más altos (Martínez – Pastor *et al.*, 2005), mientras que en el procesamiento dentro de los meses de noviembre y diciembre en ciervos ibéricos no mostraron una alta motilidad en masa (Fernández – Santos *et al.* 2009). La segunda quizá se deba a los diferentes intervalos de tiempo transcurridos entre la muerte del animal y la llegada de los testículos al laboratorio para el procesamiento de las muestras. Estos tiempos fueron mayores en el estudios de Martínez *et al.* (2008) y de Martínez – Pastor *et al.* (2005), oscilando entre las 18 y 26 horas post mortem en el primer caso, y de 24 horas post mortem en el segundo; mientras que en los experimentos de Malo *et al.* (2005), el tiempo transcurrido fue considerablemente menor. En este estudio no se midió el efecto del tiempo de procesado debido a que no existió variación en los tiempos de procesado de las muestras (4 horas y 30 minutos).

Respecto al patrón de motilidad progresiva se observó que los espermatozoides recuperados del epidídimo de machos ovinos se muestran activos con diluyente, al igual que fue observado por Peña (2013) en el ciervo ibérico, presentan una motilidad progresiva sin alterar la dirección de su trayectoria excepto cuando chocan entre ellos o se cruzan con obstáculos. Así mismo los valores de los parámetros de motilidad progresiva observados en este estudio fueron muy similares a los presentados en el ciervo ibérico, con un 69% de motilidad progresiva (Peña, 2013), contra un 70% de motilidad progresiva encontrado en este estudio. Es de mencionar que los valores de las muestras para motilidad progresiva

fueron menores en ovinos Dorper, Rambouillet, Hampshire y Pelibuey. En ciervos ibéricos (Martínez – Pastor *et al.*, 2005; Fernández – Santos, *et al.*, 2009) se encontraron valores semejantes a los encontrados en nuestro estudio y a su vez superiores a los observados por Martínez *et al.* (2008). La motilidad progresiva es una manifestación de la competencia estructural y funcional del espermatozoide; por lo que los porcentajes de espermatozoides móviles y progresivos, están normalmente correlacionados de forma positiva con la integridad de la membrana plasmática y la morfología normal (Kumi – Diaka, 1993; Rodríguez – Gil *et al.* 1994).

Además, el contacto con el diluyente de congelación puede alterar la motilidad de los espermatozoides (Okamura *et al.*, 1995; De Paw *et al.*, 2003) y, en el caso de espermatozoides de muestras epididimarias, estos pueden sufrir algunos cambios cuando entran en contacto con el diluyente, activándose su motilidad (Gerber *et al.*, 2001; Fernández – Santos *et al.*, 2006). En este sentido Martínez – Pastor *et al.* (2005) comprobaron que los espermatozoides de ciervos ibéricos recién recuperados de la cola del epidídimo se movían lentamente y presentaban un batido del flagelo débil y un desplazamiento lento, que en ocasiones podían hacerlos parecer inmóviles; sin embargo, esto no ocurría en las muestras de la fase de precongelación, seguramente con la adición del diluyente, observándose un aumento importante del porcentaje de espermatozoides móviles en pre congelación al compararlo con las muestras iniciales.

En cualquier caso a pesar del descenso del 20.9% en el porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación en el caso de ovinos Suffolk, la mejora en los valores medios de los parámetros de motilidad observados en este estudio, mostró un descenso de 4.23% de las muestras precongelación, parece indicar que la metodología seguida en el proceso de congelación – descongelación podría ser adecuada, posiblemente a la utilización de un diluyente, un crioprotector y, unas velocidades de refrigeración, congelación y descongelación adaptadas a la especie estudiada y al tipo de muestras (Mazur 1994; Parks y Graham, 1992; Salamon y Maxwell, 1995; Waltson, 1995; Waltson, 2000), que en este caso han sido las procedentes de los epidídimos de ovinos. Así se han comprobado que el daño

que experimentan los espermatozoides durante la criopreservación disminuye si se elige el diluyente de congelación adecuado.

Otra razón podría ser que, los espermatozoides del epidídimo pueden experimentar algunos cambios que activan su motilidad al entrar en contacto con el diluyente (Gerber *et al.*, 2001; Martínez – Pastor *et al.*, 2005), y una última explicación de los cambios aparentes de esta motilidad tras el proceso de congelación – descongelación, podría ser la muerte selectiva, debilitando o inmovilización de los espermatozoides menos móviles o con peores características después del proceso de congelación – descongelación, lo que llevaría asociado a un aumento de los valores medios en los parámetros de motilidad a la descongelación al haber quedado excluidos del cálculo de la media los espermatozoides con los peores parámetros. En otros trabajos también se han observado incrementos en parámetros de motilidad, unidos a importantes reducciones del porcentaje de motilidad tras la descongelación (Fernández *et al.*, 1990; Peña *et al.*, 2003; Martínez – Pastor *et al.*, 2005; Anel *et al.*, 2012).

Los efectos del proceso de congelación – descongelación, en esta estudio se han demostrado que los espermatozoides procedentes del epidídimo de machos ovinos presentan una buena resistencia a la criopreservación, lo que podría explicarse fundamentalmente por la utilización de un diluyente, un crioprotector, y una velocidades de refrigeración, congelación y descongelación adaptadas a las muestras epididimarias de ovinos.

11. CONCLUSIONES

- La comparación de los métodos de recolección de espermatozoides epididimarios (corte sagital vs lavado caudal del epidídimo) no se encontraron diferencias significativas para todas las variables analizadas (volumen, motilidad en masa y progresiva, espermatozoides vivos).
- En la evaluación previa a la congelación y posterior a la descongelación, ambos procedimientos son viables y efectivos para ser considerados dentro de las técnicas de biotecnología reproductiva asistida en ovinos.
- Los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo en machos ovinos se muestran activos (motilidad en masa y progresiva).
- Los espermatozoides procedentes del epidídimo de ovinos presentan una buena resistencia a la criopreservación, observándose una pérdida de calidad en la motilidad en la evaluación posterior al proceso de descongelación.
- Existió un mayor porcentaje de espermatozoides móviles y una mayor calidad de movimiento durante los meses de fotoperiodo decreciente.
- La condición corporal de los machos ovinos no mostró un efecto significativo. Es importante considerar que los resultados por el efecto de la raza, deberá de considerarse con cierta precaución, debido a que se empleó un reducido número representativo de muestras por raza.
- Los efectos de la raza, condición corporal y el mes de procesado de las muestras tuvieron efectos significativos ($P < 0.05$) sobre las variables del volumen de la muestra, motilidad en masa y progresiva, así como del % de espermatozoides vivos; en tanto que estos efectos no fueron significativos sobre la concentración espermática ($P > 0.05$) pre y poscongelación.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aisen, E.G.; Medina, V.H.; Venturino, A. (2002) Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology* 57:1801-1808.

Aké-López J., E. Cavazos-Arizpe, J.G. Magaña-Monforte, F. Centurión-Castro and C. Silva-Mena. (2010). Effect of Age Postmortem time on Some White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus texanus*) Epididymal Sperm Characteristics and response of cryopreservation. *American Journal of Animal Veterinary Science* 5 (3) 183-186.

Amann RP, Hay SR, Hammerstidt RH. 1982. Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *BiolReprod* 27:723-733.

Amann RP. 1983. Endocrines changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 66 (12): 2606-2622.

Amann RP. 1988. Maturation of spermatozoa. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin. pp 320-328.

Amann RP, Schanbacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.*, Vol 57, Suppl. 2: 380-403

Anel, L., Gerra, C., Alvarez, M., Anel, E., Martinez, A.F., Boixo, C.J., Kaabi, M., Herraez, P., and Paz, P. 2002. Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervuselaphus hispanicus*). *Theriogenology*; 57: 577

Armas RSM. 2009. Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninos post orquiectomía. Tesis licenciatura. universidad mayor de san marcos. Lima-Perú.

Asher G. 1998. Artificial breeding technologies for farmed deer. *Proc 2nd World Deer Farming Congress*. Irlanda. pp 161-170.

Asher G, Berg D, Evans G. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *AnimReprodSci* 62:195-211.

Asher G, Fisher M, Fennessy PF, Mackintosh H, Jabbour HN, Morrow C. 1993. Oestrous synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer (*Cervuselaphus*) and fallow deer (*Damadama*). *AnimReprodSci* 33:241-265.

Axnér E, Ström Holst B, Linde-Forsberg C. 1999. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50:973-979.

Banda RD, Shirley EV, Ruiz GL, Sandoval RM, Rodríguez LIC, Valdivia CM, Santian AA. 2010. Efecto de diluyentes base A tris y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 21 (2): 145-153.

Barrios AD. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fertilizante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. *Memorias, XI congreso venezolano de producción e industria animal.* Venezuela. Pp:14.

Briz MD, Bonet S, Pinart B, Egozcue, Camps R. (1995): Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *Journal of Andrology* 16, 175-186.

Brooks DE, Higgins SJ. 1983. Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid spermatozoa in the rat epididymis. *J Reprod Fert* 59:363-375.

Chenoweth P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bulls. En: Youngquist: *Current therapy in large animal theriogenology.* Saunders, 1° Edición, pag. 217

Chung J. 1997. Effects of sperm treatment on fertilization and in vitro development of bovine follicular oocytes. *Korean. J. Emb. Trans.* Vol. 12(2) 189-194

Cooper TG. 1999. Epididymes. In: *Encyclopedia of Reproduction.* Knobil E, Neill JD (Eds). Academic Press. Vol 4:1-17.

Cortés S. 2003. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid, España.

Cooper, G. 1986. *The epididymis, Sperm Maturation and Fertilisation.* SpringerVerlag, Berlin.

Cunningham JG. 2003. *Fisiología veterinaria.* 3ª ed. Madrid: Elsevier. 576 p.

Curry MR, Watson PF. 1995. Osmotic effects on ram and sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31:39-46.

De León A, Palma M, Mejía O. 2008. Criopreservación de semen de venados cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) obtenido mediante electroeyaculación o del epidídimo. Financiamiento PAPPIT-UNAM.

De Lucas T.J., Arbiza A.S. 2004. *Razas Ovinas.* Editores Mexicanos Unidos, S.A. México D.F.

De Pauw IMC, Goff AK, Van Soom A, Verberckmoes S, de Kruif A. 2003. Hormonal regulation of bovine secretory proteins derived from caput and cauda epididymal epithelial cell cultures. *J Androl* 24:401-407.

Domínguez RA, 2010. Estudio del estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios criopreservados de ciervo (*Cervus elaphus*). Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. 185pp.

Dyce, KM., Sack WO., Wensing CJG. (2007): Anatomía Veterinaria. 3ª ed., manual moderno, México.

Fernández-Santos RM, 2006. Estudio y mejora de la congelabilidad del material espermático obtenido post mortem en el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. 137pp.

Ferreira NJ y Pérez FDR. (2001): Biotecnologías de la reproducción caprina y ovina. 1ª ed., gráfica y editora 2M Ltda, Fortaleza Ceará – Brasil.

Foot RH. 1975. Estrus detection and estrus detection aids. *J. Dairy Sci*; 58:248-256

Friedmann Y, MacMallum C, Killian I, Grobler DG, Denniston R. 1999. Changes in motility and morphological characteristics of African buffalo (*Syncerus caffer*) sperm during storage of epididymis. *Theriogenology*, 51:332.

Garde J, Aguado M, Perez S, Garrido D, Perez-Guzman M, Montoro V. 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem ram. *Theriogenology* 41: 2003.

Garde JJ, García A, Ortiz N, Gallego L. 1996. Evaluación de espermatozoides obtenidos postmortem en el ciervo. *Doñana Acta Vertebrata* 33:229-241.

Garde JJ, Ortiz N, García A, Gallego L, Landete-Castillejos T, López-Sáez A. 1998. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. *Arch Androl* 41:195-202.

Garde JJ, Anel E, López-Sáez A, Boixo JC, Ortiz N, Martínez F, Alvarez M, Gallego L, Anel L. 1999 (b). Electroeyaculación en el ciervo ibérico (*Cervus Elaphus Hispanicus*): Características espermáticas. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Lugo. pp 476-478.

Ganong W. 1990. Gónadas: desarrollo y funciones del aparato reproductor. En *Fisiología Médica*. 12ª Ed. Manual Moderno. México. 365-402.

Gerber, D., Irons, P., Herold, F.C., and Cooper, D. 2002. Quality and freezability of epididymal sperm from African Buffalo (*Syncerus caffer*) following prolonged exposure to ambient temperatures or delayed flushing. *Theriogenology*; 57: 582

Gerber D, Irons P, Herold F, Cooper D. (2002). Quality and freezability of epididymal semen from african buffalo (*syncerus caffer*) following prolonged exposure to ambient temperatures or delayed flushing. *Theriogenology*; 57:582.

Graham JK. (1994): Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 41:1151-1162.

Graham, J., Kunze, E., Hammerstedt, R., 1991, Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *BiolReprod.* 43, 55-64.

Griswold M. 1995. Interaction between germ cells and Sertoli cells en the testi. *Biol. Reprod.* 52: 211-216.

Hafez ESE. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ta Ed. IntermedicaMcGraw-Hill. México. 694 pp.

Hammersted RH. (1993): maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of effect a design of storage preservation system. *Reproduction and fertility development* 5: 675- 690.

Hishinuma, M., Susuki, K., and Sekine, J.2003.Recovery and cryopreservation of Sika Deer (*Cervusnippon*) spermatozoa from epididymes stored at 4oC. *Theriogenology*; 59: 813

Hewitt D., Leahy R., Sheldon I., England G. 2001. Cryopreservation of epididymal dog Sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67: 1-2, 101-111.

Jhonson M., Everit B. 1980. Essential reproduction. Blackwell Scientific Plublications, 1ªEdición: 33.

Kaabi M, Carbajo M, Rouissi H, Anel E, Alvarez M, Boixo JC, García C, Anel L. 1999. Efecto de la consevación *post-mortem* de epidídimos demoruco sobre la evolución de malformaciones en los espermatozoides antes y después de la congelación. XXIV Jornadas Científicas de la SEOC.Soria. pp 187-191.

Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraiez P, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of theram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60:1249-1259.

Kastelic J., Cook B., Coulter G. 1997. Scrotal- Testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bulls. 271-282.

Kikuchi, K., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J., Shimada, A., Soloy, E., and Kaneko, H. 1998.Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4oC. *Theriogenology*; 50: 615-623.

- Kilian, I, Lubbe K., Bartels, P., Friedmann, Y., And Denniston, R.S. 2000. Evaluating epididymal sperm of African wild ruminants: longevity when stored at 4°C and post-thaw viability following cryopreservation. *Theriogenology*; 53: 336.
- Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *Journal of Reproduction and Fertility* 116: 217 -222.
- Kumi-Diaka J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39: 1279-1289.
- Krzywinski A. 1976. Collection of red deer semen with the artificial vagina. VIII Congress International of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Krakow. Vol 4:1002-1005.
- Krzywinski A, Jaczewski Z. 1978. Observations on the artificial breeding of red deer. *Symp Zool Soc Lond* 43:271-287.
- Larsson ALF., Stenberg K. 1978. Reversible Effects on Cellular Metabolism and Proliferation by Trisodium Phosphonofomate. *American Society for Microbiology*. 14 (5): 727-730.
- Luvoni, G.C., Ruggiero, C., Marinoni, G., and Kalchschmidt, E. 2002. Effect of taurine-containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*; 57: 466
- Lubbe, K., Smith, R.L., Barrels, P., And Godke, R.A. 1999. Freezing epididymal sperm from White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*) Treated with different cryodiluents. *Theriogenology*; 51: 288
- Maddocks S., Kerm S., Setchell B., 1995. Investigating local regulation of the testes of ruminants. *J. Reprod. And Fertil.* 49: 309-319.
- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, Garcia AJ, Gomendio M, Roldan ER. (2005): Male fertility in natural population of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Boil. Reprod.* 72: 822-9
- Manual Merck de Veterinaria. 2007. Capítulo de reproducción. Editorial Océano. Pp: 2720.
- Martinez F, Martinez- Pastor F, Alvares M, Fernandez – Santos R, Ernesto M, de Paz P, Garde J, Anel L. (2008): Sperm parameters on male Iberian red deer; electroejaculation and post mortem collection. 70: 216-226
- Martínez-Pastor F, Macías VG, Álvarez M, Chamorro C, Herraiz P, Paz P, Anel L. 2005. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65: 471-485.

Mazur P, Rall WF, Rigopoulos N. 1981. Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Biophys J* 36:653-675.

Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol*, 247:125-142.

Mazur P. 1994. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:125-142.

Muñoz TS. 2008. Congelación de semen de pudú (*Pudu pudu*): Efecto de los diluyentes tris y leche descremada SB sobre semen diluido. Tesis de licenciatura. Valdivia, Chile.

Nadler, C. F., Hoffmann R. S. y Woolf A. (1973b): G-band pattern as chromosomal markers and interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). *Experientia*, 19: 117-119.

Nakatsukasa E., Inomata T., Ikeda T., Shino M., Kashiwazaki N. 2001. Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Reproduction – Cambridge* 122 (3): 463-467.

Okamura N. (1998). Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation. En: The 6th MAFF International Workshop on Genetic Resources. Tsukuba Ibaraki, Japón, Pp 123-134.

Okamura N, Onoe S, Sugita Y, Paquignon M, Dacheux F, Dacheux J. (1995) Water insoluble fraction of egg yolk maintains porcine sperm motility by activating adenylate cyclase. *Mol Reprod Dev* ; 28:136–142.

Orgebin-Cris MC., Danzo BJ., Eller BC. 1975. Changes in 5 α - dihydrotestosterone binding to epididymal cytosol during sexual maturation in rabbits: correlation with morphological changes in the testis and epididymal. *Mol cells endocrinol.* (3) pp: 203-220.

Ortiz, N. 2000. Estudio de las características espermáticas y de la criopreservación en espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico obtenidos postmortem. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. 283 pp.

Parks EJ, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.

Peña HA. 2013. Evaluación objetiva de la motilidad de espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico. Relacionados con la congelabilidad y calidad del semen. Tesis doctoral. La Mancha, España.

Perez-Garnelo, S.S., Borque, C., Delclaux, M., Talavera, C., Lopez, M., and De La Fuente, J. 2002. Post-thaw seminal quality of spermatozoa obtained from the epididymis in Dorcas Gazelle (*Gazella dorcas neglecta*). *Theriogenology*; 57: 589.

Pérez .S, De la Fuente J., <http://www.Redvya.com/veterinarios/especialidades/reproducción/articulo06.ht>.

Ponglowhapan S, Chatdarong K, Sirivaidyapong S, Lohachit C. 2006. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology* 66: 1633-1636.

Reyes M C., Gagnon A., Sullivan R., Sirard M. (2000): Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture médium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J Androl.* 21 (6): 876-886

Riberiro – peres A, Munita BL, Yumi KM, Mello MMI, Ferreira SF. (2014): Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando métodos convencionales y automatizados. Jabolicabal, Brasil.

Robaire B, Hermo L. 1998. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds). Raven Press. pp 999-1080.

Rodel A.1995. Semen quality on sperm production in beff bulls with chronic dietary Vit.A a deficiency and subsequent re-alimentation.*Theriogenology* 43: 1269-1277.

Rodriguez – Gil JE, Rigau T. (1994): Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar semen. *Animal reprod sci*; 39: 141-146

Rodríguez J, Madrid- Bury N, Urdaneta A, Aranguren J, Quintero A. (2000). Análisis morfométrico del epidídimo de toros jóvenes mestizos 5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo con testículos pequeños. *Revista Científica, FCV-LUZ, Vol 10 (6), 458-467.*

Salamon S. y Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen. II. Causes of lowfertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod.Sci.*, 38:1-36. SAS, 1989. SAS/STAT User's guide (release 6.04) SAS Inst. Inc., Cary, N.C.

Salamon, S and Maxwell, W.M.C (2000). Storage of ram semen *Anim.Reprod.Sci.*, 62: 77-111.

Salisbury GW, VanDemark NL, Logde JR. 1978. *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos*. Editorial Acribia. 831pp.

Setchell BP. (1998): The Parkes lecture: heat and the testis *Journal of Reproduction and Fertility* (114) 179–194

Sheep Production Handbook. 2002. Reproduction chapter. American sheep industry association, inc. vol.7,Colorado, USA. pp: 901-939.

Sisson, S. 1993. Sistema urogenital de los rumiantes. En: Sisson y Grossman: Anatomía de los Animales Domésticos. Salvat, 5ª Edición, Vol. 1, pag. 1043-1044.

Soler AJ. 2003. Estudio de la congelabilidad de las muestras espermáticas de ciervo ibérico obtenidas post mortem: fuentes de variación. Tesis doctoral. La Mancha. España.

Soler AJ, Garde JJ, Casinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS. 2003. Sperm Cryopreservation in threespecies of endangered gazelles (*GazellaCuvieri*, *G. damamhorr*, *G. dorcasneglecta*). BiolReprod 69:602-611.

Son Chye NG, Martelli P, Liow SL, Herbert S, Oh SH. 2002. Intracytoplasmic injection of frozen-thawed epididymal spermatozoa in a nonhuman primate model, the cynomolgus monkey (*Macacafascicularis*). Theriogenology; 58(7): 1385-1397.

Strzezek J, Krzywinski A, Swidowicz K. 1985. Seasonal changes in thechemical composition of red deer (*Cervuselaphus*) semen. Anim.Reprod. Sci., 9:195-204.

Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, De la Sota RL. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. Theriogenology 66: 1637-1640.

Van Camp S. 1997. Common causes of infertility in the bull. Vet. Clin. of N.A: Food Animal Practice. 13 (2).

Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fertil Dev 7: 871-891.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. AnimReprodSci 60-61:481-492.

Watson PF, Fuller BJ. 2001. Principles of cryopreservation of gametes andembryos. In: Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future Watson PF, Holt W (Eds). Taylor and Francis. pp 23-46.

Yanagimachi R. (1994). Mammalian fertilization. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neil JD. (eds). Raven Press. New York, USA.; pp. 135-185.

Yu, I. and Leibo, S.P. 2002.Recovery of motile membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4oC. Theriogenology; 57: 1179-1190.