

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



“EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA Y FERTILIDAD *IN VIVO* DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍMIMO DE TOROS CRIOLLOS *POST MORTEM*”

TESIS

PRESENTADA POR EL BACHILLER:

ABEL ELEAZAR QUISPE QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA****ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA****"EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA Y FERTILIDAD *IN VIVO* DE
ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO DE TOROS CRIOLLOS *POST MORTEM*"****TESIS****Presentada a la Dirección de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia, para optar el título de:****MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

APROBADO POR:

PRESIDENTE

:.....

M. Sc. PEDRO ISAAC VILLALTA ROJAS.

PRIMER MIEMBRO

:.....

Mg. Sc. ROLANDO DANIEL ROJAS ESPINOZA

SEGUNDO MIEMBRO

:.....

Mg. Sc. NUBIA LILIA CATAORA FLORES.

DIRECTOR DE TESIS

:.....

Dr. MANUEL GUIDO PÉREZ DURAND.

ASESOR DE TESIS

:.....

Mg. Sc. URI HAROLD PÉREZ GUERRA.

ASESOR DE TESIS

:.....

Mg. Sc. HUGO W. DEZA CALSÍN.

ÁREA: Reproducción animal

TEMA: Fertilidad, esterilidad en animales

DEDICATORIA

A dios.

A la memoria de mis abuelos.

Con cariño y gratitud a mis padres Salomé Aludio y Margarita, que siempre han sido ejemplo de amor y entrega sin límite.

A mis queridos hermanos y hermana, Augusto, Ruth, Edward, Washington, Jamil y Dante.

A mi Abuelita Florencia, siempre estará en mi corazón.

A mis tíos/as.

Y A toda mi familia, por su apoyo y cariño.

Abel

AGRADECIMIENTO.

En primer lugar quiero expresar mis sinceros agradecimientos al Dr. Manuel Guido Pérez Duran, por su apoyo y confianza, quien me orientó, me brindó su tiempo, sus experiencias y sus conocimientos y que sin su ayuda no hubiera podido culminar con la presente tesis.

Al Mg. Sc. Uri Harold, por su ayuda en la redacción de la tesis y en la parte estadística.

Al Mg. Sc. Hugo, por su colaboración en el CIP. Chuquibambilla, con la cual fue posible la culminación de la presente tesis.

Al Mg. S. Pedro Villalta Rojas, Mg. Sc. Rolando Rojas Espinoza y a la Mg. Sc. Nubia L. Catacora Flores, por sus consejos y orientación en la redacción de la presente tesis.

A los veterinarios que laboran en el camal municipal de El Collao-llave y a todos los comerciantes de ganado, por facilitarnos las muestras que fueron necesarios para nuestro trabajo de tesis.

A mis padres, Salomé Aludio y Margarita, por su apoyo y comprensión en todo momento y gracias a ellos pude cumplir unos de mis anhelos.

A mis hermanos y hermana, y a toda mi familia, por el apoyo moral y comprensión.

A David, Mike, Hilda, Violeta, Luis y a toda su familia con quienes compartí momentos gratos e inolvidables.

A mis amigos/as Annie, Jensen, Paolo, Gaby, Joel Quina, Juan Cesar y a todos mis compañeros con quienes compartí buenos momentos durante mi vida Universitaria.

Abel

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN	01
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Anatomía y Fisiología de los Testículos	03
2.2. Anatomía y Fisiología del Epidídimo	07
2.3. Colección de Espermatozoides del Epidídimo de Toros <i>Post Mortem</i>	11
2.4. Evaluación de la Calidad Espermática de Espermatozoides del Epidídimo de Toros <i>Post Mortem</i>	13
2.5. Congelación de Espermatozoides del Epidídimo de Toros <i>Post Mortem</i>	20
2.6. Inseminación Artificial con Espermatozoides del Epidídimo de Toros <i>Post Mortem</i>	29
III. MATERIAL Y MÉTODOS	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
V. CONCLUSIONES	77
VI. RECOMENDACIONES	78
VII. BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXO	84

RESUMEN

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA-Puno. El objetivo es determinar la sobrevivencia *in vitro* y la fertilidad *in vivo* de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de toros criollos *post mortem*. Se colectaron 18 pares de testículos de toros criollos adultos del camal Municipal de El Collao-Ilave, inmediatamente después del sacrificio de los mismos. Una vez transportado al laboratorio cada par de testículos fueron almacenados en refrigeración a 5°C de forma aleatorio durante 0 (n=6), 12 (n=6) y 24 (n=6) h. Al final de cada periodo los espermatozoides de la cola del epidídimo fueron colectados y evaluados antes de la congelación y después de la descongelación en motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad de acrosoma. Los espermatozoides fueron congelados con dilutor Tris-yema de huevo (10%)-glicerol (7%) en pajillas de 0.25 mL con 30×10^6 espermatozoides motiles/pajilla. La prueba de fertilidad *in vivo* se realizó en 13 vacas Brown Swiss del CIP. Chuquibambilla. Los resultados obtenidos en los periodos de refrigeración a 5°C en 0, 12 y 24 h antes de la congelación y después de la descongelación fueron en motilidad total: 80.06 ± 11.68 , 74.43 ± 10.78 , $70.25 \pm 14.47\%$ ($p > 0.05$) y 49.26 ± 15.68 , 26.41 ± 6.82 , $24.92 \pm 4.89\%$ ($p \leq 0.05$); en motilidad progresiva: 44.76 ± 10.31 , 37.41 ± 12.20 , $30.97 \pm 9.75\%$ ($p > 0.05$) y 19.57 ± 5.18 , 12.55 ± 4.25 , $11.19 \pm 2.72\%$ ($p \leq 0.05$); en test hiposmótico: 69.72 ± 7.20 , 67.87 ± 4.46 , $60.31 \pm 7.91\%$ ($p > 0.05$) y 53.21 ± 5.53 , 31.99 ± 6.87 , $27.47 \pm 4.86\%$ ($p \leq 0.05$); en integridad de acrosoma: 62.18 ± 7.66 , 64.83 ± 3.69 , $59.51 \pm 7.13\%$ ($p > 0.05$) y de 48.33 ± 4.45 , 28.90 ± 7.25 , $23.87 \pm 6.95\%$ ($p \leq 0.05$), respectivamente. En conclusión se encontró que las características espermáticas evaluadas se preservaron antes de la congelación pero fueron afectados por efecto del periodo de refrigeración a la descongelación y por efecto del proceso de la congelación y los espermatozoides congelados-descongelados tienen habilidad de fertilizar. Por lo tanto, los espermatozoides de la cola epidídimo de toros *post mortem* son congelables y pueden aplicarse en técnicas reproductivas asistidas.

Palabras Clave: Toro criollo, epidídimo, congelación, inseminación artificial, fertilidad.

I. INTRODUCCIÓN

La recuperación y congelamiento de espermatozoides viables de epidídimos de animales muertos, ha sido considerado como una herramienta muy importante para preservar gametos de machos así como para el mantenimiento de bancos de germoplasma (Kaabi *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2007).

La cola del epidídimo es uno de los principales lugares de almacenamiento de espermatozoides antes de la eyaculación, cuyo ambiente provee una condición ideal para la supervivencia espermática. Así espermatozoides almacenados dentro de esta estructura retienen su motilidad y su capacidad fertilizante (White, 1993; Soler *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009). La cola del epidídimo es capaz de almacenar un número suficiente de espermatozoides para varias eyaculaciones, lo que determina que este lugar sea una fuente de germoplasma, aun poco explorada comercialmente en el toro (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014).

Generalmente se asume que los gametos dentro del cuerpo de los animales degeneran rápidamente después de la muerte (Soler *et al.*, 2005), pero muchos estudios han demostrado que los espermatozoides recuperados de especies *post mortem*, incluso muchas horas después de la muerte, retienen sus funciones (Songsasen *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Kishikawa *et al.*, 1999; Yu y Leibo, 2002). Sin embargo, la viabilidad de los espermatozoides puede ser afectada por la duración y la temperatura al cual el animal muerto o los testículos son sometidos antes de que los espermatozoides sean colectados de la cola del epidídimo. Además bajo una variedad de condiciones no siempre es posible la inmediata colección y congelamiento de espermatozoides del epidídimo, debido a la falta de técnicos y/o equipos (Kaabi *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2005). Por otro lado, estudios realizados en diferentes especies (ratón, perro, ciervo,

toro) han demostrado que cuando los machos o testículos son conservados por refrigeración después de la muerte, el esperma permanece viable y con capacidad fertilizante por extensos periodos de tiempo (Songsasen *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Kishikawa *et al.*, 1999; Yu y Leibo, 2002; Costa *et al.*, 2011). Además los espermatozoides preservados bajo esta condición son exitosamente congelables (Kaabi *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2011).

En bovinos, existen pocos estudios sobre la colecta, criopreservación y uso en técnicas reproductivas asistidas utilizando espermatozoides de la cola del epidídimo, teniendo en cuenta que en algunas situaciones, esta puede ser la última oportunidad para la preservación de los gametos de un toro. Se realizó ésta investigación con la finalidad de recuperar y congelar espermatozoides de la cola del epidídimo de toros *post mortem*, con su consiguiente aplicación en técnicas reproductivas asistidas. Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo de investigación es determinar la sobrevivencia *in vitro* y la fertilidad *in vivo* de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de toros *post mortem*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LOS TESTÍCULOS

2.1.1. ANATOMÍA DE LOS TESTÍCULOS

Los testículos se encuentran localizados en la región inguinal, incluidos en un divertículo del abdomen denominado bolsa testicular (escroto). Se encuentran en posición vertical y tienen un contorno oval elongado. El testículo de un toro adulto mide entre 10 – 12 cm de largo, sin el epidídimo; con este último unos 15 cm. Su anchura es de unos 6-8 cm y el diámetro craneocaudal es prácticamente el mismo. La circunferencia total de los dos testículos, dentro del escroto, mide aproximadamente 42 cm. Pesan unos 300 g (Sorensen, 1982; Sisson, 2001; Galina, 2008).

El testículo consta de dos tejidos de cubierta: la túnica vaginal visceral y la túnica albugínea. Internamente, está constituido por los túbulos seminíferos, células intersticiales, nervios, vasos sanguíneos, *rete testis* y conductos eferentes (Sorensen, 1982).

Dentro de los testículos, las unidades productoras de espermatozoides son los túbulos seminíferos, a todos éstos se les llama parénquima testicular. Los túbulos seminíferos integran la mayor parte de la masa testicular, son muy largos y de dimensiones microscópicas. Los túbulos son, al principio, muy tortuosos; se unen con otros y forman unos túbulos rectos mayores y finalmente forman, en el mediastino, una red, llamada *rete testis*. El tubo seminífero está revestido por una membrana basal, sobre la que se asientan las primeras células espermatogénicas (las espermatogonias) y las células de sostén. Las células de sostén o llamadas células de Sertoli son ramificadas, con forma columnar y se extienden desde la membrana basal, hasta la luz del tubo, a través de

todas las capas de células espermatogénicas en desarrollo; el número de células de Sertoli en un corte transversal del túbulo seminífero del toro es de 25 a 30 (Sorensen, 1982; Sisson, 2001; Galina, 2008).

Entre los túbulos hay masas de células intersticiales o de Leydig, que producen las hormonas sexuales del macho. Tienen forma poliédrica irregular. Constituyen aproximadamente 7% del volumen testicular total en el toro (Sorensen, 1982; Hafez y Hafez, 2002).

La *rete testis* se encuentra en el mediastino y están integrados por muchos canales que se interconectan. Estos reciben los espermatozoides provenientes de los túbulos seminíferos. Actúan como pasaje hacia los conductos eferentes. Los conductos eferentes del testículo reciben los espermatozoides inmaduros que provienen de la *rete* los llevan sobre la superficie del testículo, hasta el epidídimo. En el toro existen 10 – 20 tubos colectores de esperma (Sorensen, 1982; Galina, 2008).

2.1.2. FISIOLÓGÍA DEL TESTÍCULO

El testículo tiene dos funciones principales que son: a) la esteroidogénesis o secreción de hormonas masculinas, como la testosterona y la androstenediona a través del proceso de esteroidogénesis, en las células de Leydig; y b) la gametogénesis o producción de espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis, en los túbulos seminíferos (Amann y Schanbacher, 1983).

2.1.2.1. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es la suma de transformaciones que resultan en la formación de espermatozoide a partir de espermatogonia, mientras que se mantiene el número de espermatogonias (Amann y Schanbacher, 1983).

La espermatogénesis comprende fases secuenciales de mitosis, meiosis y postmeiosis de células espermáticas precursoras. Este proceso se lleva a cabo en los compartimientos basal y adluminal del túbulo seminífero, separados funcionalmente entre sí por las células de Sertoli, que garantizan el ambiente propicio para que se lleve a cabo la espermatogénesis y resultan en la formación de los espermatozoides (Amann y Schanbacher, 1983; Galina, 2008).

La espermatogénesis se inicia en la pubertad y tiene una duración aproximadamente de 61 días en el toro (Amann y Schanbacher, 1983).

La espermatogénesis incluye dos fases: a) la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren una 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 (Sorensen, 1982; Hafez y Hafez, 2002).

A. Espermatocitogénesis

Después de la pubertad y durante la vida reproductiva del macho, las espermatogonias se dividen de una manera rápida y sucesiva por mitosis. Donde las espermatogonias AO (células tronco) son la fuente para la continua producción de gametos, a partir de los cuales se originan las espermatogonias tipo A1 y otras células germinales. Las espermatogonias tipo A1 se dividen progresivamente para formar los tipos A2, A3 y A4. El tipo A4 se divide una vez más para formar espermatogonias intermedias (tipo In), que a su vez forma la espermatogonia tipo B. Todas ellas representan estadios sucesivos del desarrollo de la espermatogonia, conocida también como fase proliferativa (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

Las espermatogonias tipo B se dividen por lo menos una vez, y probablemente dos veces, para formar los espermatocitos primarios. El espermatocito primario realiza su primera división meiótica o reduccional para dar origen a los espermatocitos secundarios. Ésta es una fase prolongada donde ocurren los cambios de material genético entre los pares de cromosomas. Durante este periodo no sólo se realiza la reducción en el número de cromosomas somáticas, sino que también los cromosomas sexuales se separan de manera que un espermatocito secundario recibe el cromosoma X y el otro el cromosoma Y. en la segunda división meiótica de cada espermatocito secundario se produce dos espermátides (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

El proceso divisional completo de la espermatogénesis, desde espermatogonias hasta espermátides, requiere unos 45 días en el toro (Hafez y Hafez, 2002).

B. Espermiogénesis

Consiste en la transformación de las espermátides, redondas, en espermatozoides estructuralmente equipados para fertilizar al ovulo. Estos son cambios que ocurren cuando las espermátides están en contacto con el citoplasma de las células de Sertoli. Durante este proceso comienzan a diferenciarse las partes que constituyen el espermatozoide, primero la cabeza, el acrosoma, el cuello y la cola. Las diversas etapas de transformación de las espermátides se dividen en cuatro fases: de Golgi, de encasquetamiento, acrosómica y de maduración (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

La liberación de las células germinales formadas al interior de los túbulos seminíferos se denomina espermiación. Los espermatozoides son liberados con una gota citoplasmática en el cuello (gota proximal) (Hafez y Hafez, 2002).

2.2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL EPIDÍDIMO

2.2.1. ANATOMÍA DEL EPIDÍDIMO

El epidídimo es un tubo muy largo, que mide alrededor de 36 – 40 m de largo en el toro, de curso tortuoso, empaquetado en un saco de tejido conectivo que es una extensión de la túnica albugínea. Es una estructura adyacente al testículo, que se encarga de funciones como las de transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides (De Pauw, 2003; Galina, 2008; Hafez y Hafez, 2002).

Se reconocen tres regiones anatómicas del epidídimo: cabeza, cuerpo y cola. Su cabeza, en la que 10 - 20 conductos eferentes que emergen del testículo se unen al conducto epididimario. Esta forma una estructura aplanada que se curva sobre el polo dorsal, cerca del primer tercio de su recorrido hasta el borde craneal del testículo; el estrecho cuerpo del epidídimo, se extiende hacia el polo distal del testículo y se une firmemente a la superficie caudomedial de este último y, termina en la amplia cola. La cola del epidídimo tiene forma cónica y se une estrechamente por su base mayor al testículo. El epidídimo es, al principio, muy arrollado, luego se endereza un poco en la región llamada del cuerpo, para volverse muy espiralado en la cola (Noakes *et al.*, 2001; Sisson, 2001; Hafez y Hafez, 2002).

Histológicamente pueden distinguirse tres segmentos del conducto del epidídimo, los cuales no coinciden con las regiones anatómicas macroscópicas. Está cubierto por una membrana lustrosa de tejido conectivo llamado serosa, la cual le confiere su forma y lo sostiene. Por debajo de la misma el conducto del epidídimo tiene una notable capa de fibras musculares circulares, cuyas contracciones peristálticas ayudan a desplazar el líquido a lo largo del tubo. El epidídimo presenta un epitelio pseudoestratificado, integrado por células basales redondeadas y células columnares. La superficie de las

células columnares está recubierta por *microvilli* largos y ramificados de formas irregulares, denominados estereocilios. Hay una disminución progresiva de la altura del epitelio y los estereocilios, y ensanchamiento de la luz a través de los tres segmentos (Hafez y Hafez, 2002; Junqueira y Carneiro, 2005).

2.2.2. FISIOLÓGÍA DEL EPIDÍDIMO

El epidídimo transporta espermatozoides distalmente desde el testículo por el conducto deferente, y durante este tránsito dichas células experimenten un proceso de maduración en el que adquieren la capacidad potencial de fecundar óvulos (Hafez y Hafez, 2002).

El epidídimo es un “tejido diana de andrógenos”, donde el metabolismo, la secreción epitelial y maduración de los espermatozoides es regulado por andrógenos (Brooks, 1983; Robaire y Hermo, 1988). La concentración de andrógenos en el epidídimo, especialmente en la región de la cabeza, es muy alta en comparación con la concentración presente en el suero (Pujol *et al.*, 1976).

El epidídimo presenta diversas funciones como las que se mencionan a continuación:

2.2.2.1. Mecanismos de transporte

Inicialmente, el transporte de los espermatozoides hacia el epidídimo se debe al flujo de las secreciones testiculares y posteriormente a la adición de la actividad ciliar del epitelio luminal y de la actividad contráctil del músculo liso de la pared del conducto deferente (Galina, 2008).

El paso de los espermatozoides a través del epidídimo es relativamente lento, de 7 a 11 días en el toro, y depende de contracciones localizadas de la pared de dicho conducto a una frecuencia de tres veces por minuto y por el flujo de secreciones del mismo. Las

contracciones musculares son más frecuentes en la cabeza del epidídimo, disminuyen en el cuerpo y caen drásticamente en la cola, donde los espermatozoides son almacenados antes de ser eyaculados o expulsados en la orina (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

2.2.2.2. “Maduración Epididimal” de espermatozoides

Durante el tránsito epididimal el espermatozoide experimenta una serie de cambios funcionales que le dan la capacidad de fertilizar un ovulo, proceso que ha sido llamado “maduración epididimal” (Galina, 2008).

En todas las especies, los espermatozoides tomados directamente de la porción anterior de la cabeza del epidídimo no son capaces de fecundar a un ovulo recién liberado, pero su capacidad aumenta en la porción posterior de la misma, y es siempre máxima en los espermatozoides tomados de la cola del epidídimo. Probablemente esto tiene relación con las modificaciones estructurales que ocurren durante su paso por cada uno de las regiones de éste órgano (Igboeli y Foote, 1968; Galina, 2008).

Estos cambios incluyen: la adquisición progresiva de motilidad, la habilidad para unirse a la zona pelúcida, de sufrir la reacción acrosomal y de penetrar a la zona pelúcida. Estos cambios funcionales, incluye la maduración de organelos celulares (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

Durante el tránsito por el epidídimo, la gota citoplasmática emigra desde la región del cuello hasta un sitio cercano al anillo citoplasmático. La presencia de dicha gota en una cantidad importante de espermatozoides eyaculados es indicativa de inmadurez (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

Bioquímicamente, el espermatozoide experimenta cambios en la membrana plasmática, en el acrosoma, en la placa basal, en las mitocondrias, en las fibras densas externas, en la hoja fibrosa y en el núcleo (Galina, 2008).

2.2.2.3. Desarrollo del potencial fecundante en el epidídimo

Los espermatozoides desarrollan su capacidad inicial de fecundar óvulos durante su transporte por el epidídimo. Dicha capacidad se considera potencial, porque tales células deben experimentar capacitación antes de que puedan penetrar en los óvulos. El desarrollo de la capacidad fecundante se asocia con cambios en varios aspectos de la integridad funcional de los espermatozoides: a) desarrollo del potencial para la motilidad progresiva sostenida, donde los espermatozoides presentan un movimiento en línea recta y vigorosa b) modificaciones de los patrones metabólicos y el estado estructural de los organelos específicos de la cola, c) cambios en la cromatina nuclear, d) cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática, e) movimiento y pérdida de la gota citoplasmática, y f) modificación, cuando menos en algunas especies, de la forma del acrosoma (Amann y Schanbacher, 1983; Hafez y Hafez, 2002).

2.2.2.4. Almacenamiento de espermatozoides

El principal sitio de almacenamiento de los espermatozoides dentro del aparato reproductor del macho es la parte caudal (cola) del epidídimo, que contiene el 70% de la cantidad total de gametos presentes en el epidídimo y conducto deferente, mientras que este último contiene sólo el 2%. Los componentes secretorios de las células epiteliales que revisten el epidídimo, como el “factor de inmovilidad” en el toro, probablemente prolonga la supervivencia de los espermatozoides impidiendo un metabolismo innecesario (Hafez y Hafez, 2002). En este estado de quiescencia de los

espermatozoides son almacenados por periodos relativamente largos durante el cual mantienen su motilidad y su capacidad de fertilización, la cual es favorecida por un ambiente apropiado para la sobrevivencia de los espermatozoides (De Pauw, 2003). Aunque este ambiente es favorable para su supervivencia, los espermatozoides no se preservan por tiempo indefinido (Hafez y Hafez, 2002).

La cola del epidídimo es caracterizado por pH bajo y por alta osmolaridad del plasma, los espermatozoides son almacenados a alta concentración y con baja tensión de oxígeno (De Pauw, 2003).

2.2.2.5. Eliminación de espermatozoides no eyaculados

La mayor parte de los espermatozoides no eyaculados se eliminan gradualmente por excreción en la orina. Aquellos que no se eliminan en la orina experimentan envejecimiento gradual. Primero pierden su capacidad fecundante, luego su motilidad y, finalmente se desintegran. Los eyaculados que se colectan después de reposo sexual prolongado suelen contener un alto porcentaje de espermatozoides degenerados o viejos (Amann y Schanbacher, 1983; Hafez y Hafez, 2002).

2.3. COLECCIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS DEL EPIDÍDIMO DE TOROS

POST MORTEM

Existen varios protocolos de recuperación de espermatozoides del epidídimo, las que se describen a continuación.

A. Recolección por Flujo Retrógrado: Consiste en diseccionar los vasos deferentes y la cola del epidídimo y se aíslan del resto del epidídimo realizando un corte en la unión del cuerpo y la porción proximal de la cola. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocó en una placa de Petri precalentada a

37°C y por la región libre del vaso deferente se coloca una aguja (21 G) de punta roma dentro del lumen del vaso. Con una jeringa se llena con "medio de lavado" (medio de congelación o PBS modificado) y con esta jeringa se perfunde lentamente dentro del lumen del vaso deferente. Al final se perfunde, aire para garantizar la extracción completa del contenido epididimal, realizando una presión suave y continua con la jeringa, aparece por el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario representado por un líquido espeso y cremoso (Barrios, 2002; Martínez-Pastor, 2004; Albers y Barrios, 2006).

- B. Método de desmenuzamiento:** Consiste en donde la cola del epidídimo bajo condiciones asépticas es completamente desmenuzada (cortada finamente) en una placa Petri que contiene entre 10 a 20 mL de medio de PBS modificado. El contenido de la placa Petri se vierte en una jeringa de 20 mL (usando un embudo de vidrio) para forzar el material desmenuzado por un filtro estéril de 0.4 – 0.75 micrones, y ese filtrado se recoge en tubos de centrífuga (50mL), este proceso se repite con 10 -20 mL de medio de lavado adicional. La centrifugación se realiza a baja velocidad (300 x g) por 5 min para concentrar la muestra y el sobrenadante se descarta (Barrios, 2002).
- C. Método de corte:** Se disecciona el tejido conectivo y los vasos sanguíneos de la región de la cola, para evitar una mayor contaminación, y luego se realiza varias incisiones (cortes) en la cola del epidídimo y, a continuación, pulsando manualmente esa región los espermatozoides son liberados y colectados en un tubo de 15 mL y se diluyen con un dilutor (Martins *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009).
- D. Método de Punción:** Este método consiste en que los epidídimos son separados de los testículos y cuidadosamente son diseccionados el tejido conectivo y los

vasos sanguíneos de la cola del epidídimo de manera que se expone el conducto epididimal, inmediatamente después con una aguja hipodérmica de 16 G se realiza punciones (pinchar) en varios puntos del conducto. Luego esa región de la cola del epidídimo es exprimido y el fluido rico en espermatozoides comienza a escurrir, la cual es colectada en un tubo de ensayo contenida con el dilutor (Harshan *et al.*, 2006).

2.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO DE TOROS *POST MORTEM*

Los espermatozoides son únicos entre las células en su forma y función. Los espermatozoides maduros son células terminales, el producto final de procesos de desarrollo complejos y no pueden experimentar posteriores divisiones o diferenciación, cuyo rol principal es el transporte de un paquete, constituido por el genoma nuclear y el centriolo, hasta el ovocito. Para realizar esta tarea, el espermatozoide está equipado con una batería de estructuras especializadas (una membrana plasmática que muestra áreas delimitadas, organelos con disposición específica tales como la vaina mitocondrial, y especializaciones de los mismos tales como el flagelo y el acrosoma) los que garantizan la interacción particular con el tracto genital femenino y el ovocito y sus envolturas (Rodriguez-Martinez, 2000; Hafez y Hafez, 2002).

El método estándar para evaluar la fertilidad o capacidad fecundante de machos reproductores, aparte de la evaluación directa de su capacidad para causar una preñez, es el examen de semen. Aunque ninguna prueba por sí sola puede predecir con exactitud la fertilidad de una muestra de espermatozoides, el examen de diversas características físicas del semen pueden determinar mayor potencial de fertilidad (Hafez y Hafez, 2002). Como resultado del análisis seminal podemos calificar a la muestra como apta o

no apta para su uso en inseminación artificial (Mellisho, 2010). Algunas pruebas disponibles, en el análisis de espermatozoides del epidídimo, son:

2.4.1. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

La determinación exacta del número de espermatozoides, juntamente con el volumen, define el número de dosis de semen que se podrán congelar o el número de hembras que pueden ser inseminadas (Hafez y Hafez, 2002; Baracaldo *et al.*, 2007).

La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra de semen. Entre estos métodos destaca la espectrofotometría, colorimetría, citometría de flujo y uso de cámara de recuento celular como las de Bürker, Neubauer o Thoma (Mellisho, 2010).

El método más preciso para evaluar la concentración espermática del eyaculado es el recuento de espermatozoides en un hemocitómetro, además son considerados el método estándar para la calibración de sistemas electrónicos de recuento celular. El método es bastante confiable y económico, pero requiere alrededor de 10 minutos por muestra evaluada e implica el recuento visual de los espermatozoides, que puede ser bastante tedioso (Muiño, 2008; Baracaldo *et al.*, 2007).

2.4.2. MOTILIDAD

Uno de los aspectos más importantes en la evaluación del semen es la motilidad. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la

motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular (Galina, 2008; Muiño, 2008).

Existen varias técnicas de estudio de motilidad, pero la más utilizada y a la vez la más simple es la valoración visual subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento. Para la realización de esta valoración todo material usado debe estar en condiciones de normocinesis (temperatura 37° C) (Mellisho, 2010).

2.4.3. VIABILIDAD ESPERMÁTICA

El análisis de la viabilidad espermática indica el estado de la membrana plasmática. La rotura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular, pero una membrana intacta no siempre indica que la célula sea viable. La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática. La evaluación de la viabilidad espermática se realiza usando la óptica de contraste diferencial de interferencia, la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales como el verde rápido/eosina, la eosina/azul de anilina, el azul tripan/giemsa, el amarillo de naftol/eritrosina, eosina-nigrosina, Wells, Williams, tinta china, Fuchina Fenicada, violeta de metilo y coloración de Karras (Galina, 2008; Mellisho, 2010).

La tinción eosina-nigrosina es usada comúnmente como tinción de vitalidad celular para la determinación de espermatozoides "vivos y muertos". El componente nigrosina proporciona un fondo de contraste a las células espermáticas. La eosina tiene la capacidad de penetrar o no los espermatozoides, lo cual es un indicador de la integridad de la membrana celular y en consecuencia, de la viabilidad o vitalidad celular (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014).

2.4.4. MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital de la hembra y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte a algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra, impidiendo la unión con el ovocito. Se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios: a) dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores); b) de si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente), o c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza terminal). Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen (Muiño, 2008).

Para observar la morfología espermática, generalmente se mezcla el semen con colorantes y se realiza un frotis. En otras técnicas, primero se hace un frotis del semen y luego se tiñe la laminilla, existen gran cantidad de tinciones, también es posible usar preparaciones líquidas mezcladas con el semen y observarlas al microscopio de contraste de fase (Galina, 2008).

2.4.5. TEST HIPOSMOTICO (Hypo-Osmotic Sperm Swelling Test, HOST)

Los espermatozoides de mamíferos bajo condiciones hipo-osmóticas se “hinchán” debido al influjo de agua extracelular que origina la expansión de las membranas, por lo tanto, sometiendo a los espermatozoides a estos medios se puede evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática, ya que aquellos espermatozoides que aparecen con el flagelo hinchado y plegado helicoidalmente sobre la porción intermedia son los que mantienen su membrana plasmática funcional y permite el paso de agua al interior,

para establecer el equilibrio osmótico entre los espacios intra y extracelular (Jeyendran *et al.*, 1992; Randall *et al.*, 1997).

2.4.6. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ACROSOMA

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación y ésta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con un borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja. Para determinar el estado del acrosoma se han usado desde hace mucho tiempo diferentes tinciones. Entre éstas tenemos la tinción de eosina/verde rápido, Giemsa y la de eosina/nigrosina, las dobles y triples tinciones, basadas en la combinación del azul de tripán con otros colorantes (Baracaldo *et al.*, 2007). También, últimamente la evaluación de la integridad de acrosoma, se realizan usando microscopia de contraste de fase o de interferencia, sin la necesidad de una tinción, usando una solución citrato de formalina o cualquier otro medio con la finalidad de inhibir la motilidad (Awad y Graham, 2004; Pursel *et al.*, 1972).

2.4.7. RESULTADOS SOBRE EVALUACIÓN ESPERMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES COLECTADOS DEL EPIDÍDIMO DE TOROS *POST MORTEM*

Gutiérrez *et al.* (2004a) estudiaron la concentración, motilidad y viabilidad de espermatozoides de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo de toro. Los resultados se muestran en el Cuadro 01.

CUADRO 01. Características espermáticas en tres regiones del epidídimo de toros (n=40).

Regiones del epidídimo	Peso g	Concentración x10 ⁶	% motilidad	% vivos
Cola	11.87±3.43	3309.92±2372.29	48.59±24.49	57.92±16.94
Cuerpo	8.59±2.45	1416.49±1012.38	11.08±12.39	53.64±16.80
Cabeza	14.33±3.60	1114.89±823.93	1.90±4.03	56.36±18.08
Total	34.62±7.48			

Albers y Barrios (2006) determinaron el efecto de dos protocolos de transporte (Protocolo 1: 35°C y Protocolo 2: 25°C) sobre la movilidad individual de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros cebuinos *post mortem* (n=40). La colección de espermatozoide se realizó por el método de lavado por flujo retrógrado con tris-yema-glicerol. La movilidad individual inicial fue de 17.46 ± 15.03% y 8.95 ± 10.83% (p>0.05); después de una hora fue 34.23 ± 10.57% y 26.8 ± 12.48% para el protocolo 1 y 2, respectivamente. Concluyeron que la temperatura de transporte no fue un factor influyente sobre la movilidad de los espermatozoides epididimarios.

Albers y Barrios (2011) estudiaron la concentración y el efecto de dos protocolos de transporte (Protocolo 1: 35°C y Protocolo 2: 25°C) sobre morfología de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros Cebuinos *post mortem*. La concentración se determinó mediante la cámara de Neubauer y la morfología se determinó mediante la tinción de Hema III. La concentración obtenida fue de 5.32 x 10⁸ espermatozoides/mL. Los espermatozoides normales fue de 42.76 y 39.79% (p>0.05) para los protocolos 1 y 2 respectivamente. La proporción de espermatozoides atípicos fue de 57.22 y 60.2% (p>0.05); presentando atipias primarias de 7.04 y 6% (p>0.05) y

de atipias secundarias 50.76 y 54.21% ($p>0.05$) para los protocolos 1 y 2, respectivamente.

Bertol *et al.* (2013) determinaron la viabilidad de espermatozoides colectados de la cola del epidídimo almacenados por 6 (G6), 12 (G12), 18 (G18), 24 (G24) y 30 (G30) h a 18-20°C, los cuales fueron comparados con semen colectados por electroeyaculación y preservado a 5°C. Siete días antes de la orquictomía, el semen fue colectado por electroeyaculación (EES). Los espermatozoides fueron colectados por el método de flujo retrogrado. Los parámetros espermáticos evaluados se muestran en el Cuadro 02.

CUADRO 02. Valores (media y SD) de características de espermatozoides colectados de la cola del epidídimo y por electroeyaculación (EES) (n=10).

ITEMS	Motilidad	Vigor	Anormalidades	Defectos de Acrosoma
EES	85±5.7 ^a	5±0 ^a	8.2±3.9 ^a	2.6±2.1 ^a
G6	67.5±11.9 ^b	5±0 ^a	9.5±3.1 ^a	2±1.1 ^a
G12	66.25±7.5 ^b	5±0 ^a	18±3.9 ^b	2.25±3.2 ^a
G18	67.5±2.8 ^b	4.5±1 ^b	21.25±6.1 ^{bc}	3.75±2.9 ^a
G24	58.75±8.5 ^b	4.7±0.5 ^b	19.5±3.1 ^b	1.25±1.5 ^a
G30	41.25±7.5 ^c	4±0 ^c	26.5±3.1 ^c	3.5±0.5 ^a

2.5. CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO DE TOROS

POST MORTEM

La conservación del semen en nitrógeno líquido (NL) tiene como objetivo fundamental prolongar la viabilidad de los espermatozoides de forma indefinida, ya que a temperatura ambiente o de refrigeración los espermatozoides degeneran con cierta rapidez, debidos principalmente al agotamiento de las reservas energéticas. La meta final de la preservación de semen es obtener preñeces por inseminación artificial de manera tan eficaz como después de apareamiento natural. El éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado mantenga su poder fecundante tras su descongelación. Para conseguir dicho objetivo, en todo protocolo de congelación seminal han de controlarse rigurosamente los sucesivos pasos que constituyen el proceso de la congelación, y de forma especial aquellos que influyen más directamente sobre la estructura y función de las membranas espermáticas; y sobre el metabolismo celular (Hafez y Hafez, 2002; Muiño, 2008).

2.5.1. DILUCIÓN

La dilución del semen tiene por objeto aumentar las posibilidades de utilización del semen proporcionando un volumen conveniente a fin de asegurar la tasa máxima de fertilización sin desperdiciar espermatozoides, y al mismo tiempo rodear a los espermatozoides de condiciones óptimas para el mantenimiento de la vitalidad y capacidad fecundante a través del tiempo (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

Los agentes que constituyen buenos medios de dilución realizan las siguientes funciones:

- Aportan nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides,

- Protegen contra el efecto nocivo del enfriamiento rápido,
- Son amortiguadores que impiden cambios perjudiciales en el pH al formarse ácido láctico,
- Mantienen la presión osmótica apropiada y el balance electrolítico,
- Controlan la proliferación microbiana con el uso de antibióticos.
- Incrementan el volumen del semen de modo que este pueda emplearse para múltiples inseminaciones y
- Protegen las células espermáticas durante el congelamiento. (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

Existen gran cantidad de diluyentes, desde los químicos, constituidos por soluciones salinas isotónicas, hasta aquellos que contienen sustancias orgánicas como la yema de huevo, leche o agua de coco (Galina, 2008).

2.5.2. CONGELACIÓN

La congelación de los espermatozoides viene a ser una detención del proceso de la actividad del espermatozoide. El concepto es que el espermatozoide almacenado en nitrógeno líquido (NL) a -196°C , retiene su potencial de fertilización indefinidamente. La congelación es un proceso de estrés para los espermatozoides, debido a los cambios de temperatura que sufre el espermatozoide durante el proceso de enfriamiento, asimismo, se tiene como factor de estrés también a la descongelación (Watson, 1995).

Cuando el semen se congela y conserva a muy bajas temperaturas, esto en NL (-196°C), las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen se pueda conservar durante mucho tiempo con lo que se pueden conservar genes para futuro uso y se asegure la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma se facilita el transporte de semen, y el semen se puede recoger y

conservar en épocas distintas a la estación reproductiva. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen (Evans y Maxwell, 1990).

El proceso de criopreservación de semen involucra 3 fases: a) Fase de enfriamiento, b) fase de congelamiento, y c) fase de descongelamiento (Santiani, 2003).

2.5.2.1. Enfriamiento

Durante la fase de enfriamiento la temperatura del semen diluido es disminuida gradualmente desde la temperatura de 30°C hasta 5° C. Esta fase tiene una duración por lo menos 1 a 3 horas (Hafez y Hafez, 2002). En esta fase se produce una disminución de la motilidad espermática a causa de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Wang *et al.*, 1997; Santiani, 2003). Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16° C, alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Ruiz, 2005).

Terminada la fase de enfriamiento debe haber un periodo de transición. En este periodo se adicionan sustancias crioprotectores al semen diluido, como el glicerol. El glicerol se usa casi universalmente como agente crioprotector. Por lo general, se añade glicerol al semen después de enfriarlo a 5°C; sin embargo, proporciona mayor protección cuando se le agrega inmediatamente antes de congelar. La cantidad final varía de menos 5% a 10% (Hafez y Hafez, 2002). La mezcla de semen y diluyente se deja reposar durante varias horas antes de congelarla, para permitir que las células espermáticas se equilibren con el diluyente y para que las membranas espermáticas se adapten a las bajas temperaturas (normalmente a 5°C) un tiempo de aproximadamente

de 4 a 6 horas es óptimo, dependiendo del medio utilizado (Hafez y Hafez, 2002; Muiño, 2008).

2.5.2.2. Congelación

La fase de congelamiento es un periodo crítico del proceso de criopreservación. Durante esta fase los espermatozoides son expuestos a un estrés de tipo osmótico y térmico (Watson, 2000). Cuando la temperatura alcanza los -10°C se forma núcleos de hielo de agua pura en el medio extracelular, lo que provoca un incremento progresivo en la concentración de solutos. La fracción líquida se vuelve hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, el agua contenida intracelularmente sale de la célula, lo que permite mantener el equilibrio osmótico dentro de la suspensión (Salamon y Maxwell, 2000).

La formación del hielo intracelular y el consecuente daño celular se puede evitar usando una velocidad de congelamiento adecuada, la que debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular y evitar la formación de cristales de hielo intracelular, y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente rápida para prevenir la deshidratación excesiva (Holt, 2000; Muiño, 2008).

La congelación de semen epididimario bovino se realiza en vapores de nitrógeno aproximadamente entre -110 a -114°C por un periodo de 10 minutos o enfriando entre -80 y -120°C por un periodo de 20 minutos, para finalmente ser sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) y almacenarlas hasta su uso (Singh *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009).

2.5.2.3. Descongelación

Finalmente, la fase de descongelamiento es tan importante como la fase de congelamiento, debido a que los espermatozoides tienen que atravesar nuevamente el

rango crítico de temperatura (Salamon y Maxwell, 2000). La descongelación puede realizarse a 34°C por 40 s (Hishinuma *et al.*, 2003), 37°C por min (Garde *et al.*, 1998) o a 65°C por 6 s (Kaabi *et al.*, 2003).

2.5.3. RESULTADOS SOBRE CONGELACION DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE TOROS *POST MORTEM*.

Martins *et al.* (2009), evaluaron el efecto del intervalo entre la muerte del animal y la congelabilidad de espermatozoides del epidídimo almacenadas durante 24 h, 48 h y 72 h a 5 ° C. Al final de cada período de tiempo, los espermatozoides fueron recuperados y criopreservados con dilución de Tris-yema de huevo y glicerol. Los resultados se muestran en el Cuadro 03. La concentración media de espermatozoides obtenida por epidídimo fue de 432±77 células/mL, con una producción media de 31 pajillas por epidídimo.

CUADRO 03. Características seminales antes y después de la congelación, media (D.E.) (n=25).

Variables	Refrigeración de epidídimos a 5°C			
	0 h (n=6)	24 h (n=6)	48 h (n=6)	72 h (n=7)
Motilidad Total (%) Antes.	78.1±10.2 ^{aA}	67.8±7.5 ^{abA}	60.4±11.7 ^{bcA}	56.6±10.3 ^{cA}
Motilidad Total (%) Después.	51.6±11.6 ^{abB}	45.0±20.2 ^{abB}	40.0±18.2 ^{abB}	24.1±13.5 ^{bbB}
Motilidad progresiva (0-5) Antes.	3.2±0.5 ^{aA}	2.9±0.6 ^{aA}	3.1±0.3 ^{aA}	2.8±0.8 ^{aA}
Motilidad progresiva (0-5) Después	2.6±0.5 ^{aA}	2.7±0.4 ^{aA}	2.7±0.5 ^{aA}	2.6±0.5 ^{aA}
Integridad del Acrosoma (%) Antes.	75.5±4.0 ^{aA}	72.3±17.5 ^{aA}	70.5±12.4 ^{aA}	64.0±15.4 ^{aA}
Integridad del Acrosoma (%) Después.	64.0±10.5 ^{abB}	36.2±14.5 ^{bbB}	39.5±22.0 ^{bbB}	38.2±13.0 ^{bbB}

Ribeiro-Peres *et al.* (2014), compararon dos métodos de congelación, convencional y automatizado, de espermatozoides colectados de la cola del epidídimo de toros *post mortem*. El método de colección usada fue de Flujo retrogrado con medio diluyente TRIS – yema de huevo. Fueron diluidos en medio Botubov® con 4% glicerol. Envasaron en pajillas de 0.5mL con 50×10^6 espermatozoides móviles/pajilla. La descongelación fue de 37°C por 30 segundos. Los resultados se muestran en el Cuadro 04. Concluyeron que pueden ser utilizados las células espermáticas obtenidas del epidídimo en programas de reproducción asistida.

CUADRO 04. Parámetros de calidad espermática (media \pm SD) en muestras colectadas del epidídimo de 11 toros (n=11).

Parámetros	Frescos	Congelación convencional	Congelación automatizada
Motilidad (%)	74.5 \pm 5.2 ^a	29.5 \pm 14.9 ^b	25.5 \pm 12.1 ^b
Vigor (0 a 5)	3.5 \pm 0.5 ^a	2.1 \pm 0.8 ^b	2.0 \pm 0.6 ^b
Concentración x10 ⁶	2.1 \pm 1.7		
Integridad del DNA (%)	99.2 \pm 0.9 ^a	93.1 \pm 6.1 ^b	92.4 \pm 13.1 ^b
Integridad Estructural de la membrana (%)	77.7 \pm 10.7 ^a	63.1 \pm 13.6 ^b	69.2 \pm 16.4 ^b
Integridad Funcional de la membrana (%)	69.7 \pm 9.2 ^a	60.2 \pm 10.0 ^{ab}	59.6 \pm 11.4 ^b
Viabilidad espermática (%)	69.4 \pm 10.7 ^a	53.9 \pm 11.8 ^b	52.7 \pm 9.0 ^b
Índice actividad mitocondrial	67.1 \pm 9.3 ^a	51.0 \pm 7.9 ^b	51.4 \pm 10.5 ^b

En otro estudio realizado por Martins *et al.* (2007), recuperaron y congelaron espermatozoides de la cola del epidídimo 7 h después de la muerte de los animales (n=3). Se empajillaron en volúmenes de 0.25 mL con 20×10^6 espermatozoides y equilibrados a 5°C por 4 h, para luego ser congelados en Nitrógeno líquido. Las

características seminales antes de la congelación para los toros A1, A2 y A3 fueron: 80, 80 y 70% de motilidad, 87, 92 y 90% de acrosoma intactos, 1, 3 y 2% integridad de cromatina, respectivamente. Siendo la concentración media de 440×10^6 espermatozoides/cada epidídimo. Después de la congelación las características seminales para los toros A1, A2 y A3, fue: 60, 70 y 70% de motilidad, 66.1, 68 y 60% de acrosoma intactos, 2, 5 y 2% de integridad de cromatina, respectivamente. Existiendo diferencia significativa ($P < 0.05$) en motilidad y acrosoma intactos. Los resultados muestran que los espermatozoides del epidídimo de animales muertos pueden ser criopreservados.

Gutiérrez *et al.* (2004b), realizaron recuperación de espermatozoides por lavado Retrógrado con 10 mL de diluyente a base de Tris - Yema de huevo (25%) - Glicerol (5%) ($n=48$). Los espermatozoides obtenidos permanecieron por 2 h a 5°C , para su punto de equilibrio, siendo congeladas en pajillas de 0.5 mL con 50×10^6 de espermatozoides. La descongelación se realizó a $37^{\circ}\text{C}/45$ s. Antes de la congelación los parámetros seminales fueron. 59.16 ± 10.58 (% de motilidad), 76.04 ± 6.95 (% de vivos), 64.77 ± 14.16 (% de normales), 35.32 ± 17.33 (% de anormales) y 75.54 ± 9.99 (% de acrosoma normal). La concentración total obtenida fue de 2.37×10^9 espermatozoides/epidídimo. Y después de la descongelación se obtuvieron; 35.83 ± 11.77 (% de motilidad), 60.83 ± 14.12 (% de vivos), 60.45 ± 12.98 (% de normales), 38.49 ± 19.75 (% de anormales) y 71.54 ± 11.87 (% de acrosoma normal). Concluyeron de que se podrían usar en biotecnologías como Inseminación Artificial, Fertilización *in vitro*, e Inyección Intracitoplasmática.

Harshan *et al.* (2006), evaluaron los efectos de las proteínas de unión de heparina (HBP) sobre la congelabilidad y capacidad de fertilización *in vitro* de espermatozoides de la cola del epidídimo de Búfalos. En el laboratorio los espermatozoides fueron

recuperados del epidídimo y colectados y diluidos en dilutor Tris-Yema de huevo (10%) y glicerol (7%). Los espermatozoides del epidídimo fueron envasados en pajillas de 0.5 mL, equilibradas por 3 h a 5°C. Congelaron en vapores de Nitrógeno líquido a una temperatura de -110 a -114°C por 10 min y fueron almacenados en Nitrógeno Líquido a -196°C. La descongelación se realizó a 37°C por 30 s. Los resultados se muestran en el Cuadro 05.

CUADRO 05. Media \pm D.E. de Parámetros seminales de espermatozoides de la cola del epidídimo de Búfalos con dilutor Tris-10% yema de huevo-7% glicerol (grupo control) (n=12).

Parámetros	Antes de la congelación	Después de la descongelación
Motilidad Progresiva (%)	72.75 \pm 0.91	51.58 \pm 1.18
Viabilidad (%)	83.92 \pm 0.80	68.67 \pm 0.94
Integridad de Acrosoma (%)	80.42 \pm 0.82	66.83 \pm 1.05
Test HOS (%)	72.00 \pm 0.93	59.67 \pm 0.85

Singh *et al.* (2007), determinaron el efecto de la yema de huevo sobre los efectos perjudiciales de las proteínas de unión de heparina durante la congelación de espermatozoides de la cola del epidídimo de Búfalos. Colectaron 12 pares de epidídimos. Los espermatozoides se recuperaron del epidídimo y diluidos en dilutor Tris-Yema de huevo (10%) y glicerol (7%). Los espermatozoides del epidídimo fueron envasados en pajillas de 0.5 mL, equilibradas por 3 h a 5°C. Luego congelados en vapores de NL a una temperatura de -110 a -114°C por 10 min y fueron almacenados en NL a -196°C. La descongelación se realizó a 37°C por 30 s después de 24 h de haber sido congelados. Los resultados se muestran en el Cuadro 06.

CUADRO 06. Media \pm D.E. de Parámetros seminales de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros Búfalos con dilutor Tris-10% yema de huevo-7% glicerol (grupo control) (n=12).

Parámetros	Antes de la congelación	Después de la descongelación
Motilidad Progresiva (%)	71.7 \pm 1.14	52.3 \pm 1.35
Viabilidad (%)	83.6 \pm 0.95	67.9 \pm 0.95
Integridad de Acrosoma (%)	80.2 \pm 1.08	71.8 \pm 1.08
Test HOS (%)	72.7 \pm 1.14	59.4 \pm 1.23

También se realizaron investigaciones en ovinos por Kaabi *et al.*, 2003, quienes estudiaron el efecto del intervalo entre la muerte del animal (0, 24 o 48 h) y la recuperación de espermatozoides sobre la calidad y congelabilidad de espermatozoides de la cola del epidídimo. También analizaron la temperatura de almacenamiento (22°C o 5°C). Los espermatozoides fueron diluidos con solución Tes-Tris-Fruetosa con yema de huevo (10%) y glicerol (4%). Los resultados mostraron viabilidad espermática antes de la congelación y después de la descongelación después de 48 h de la muerte del animal, sin embargo sus calidades disminuyeron significativamente cuando incrementó el tiempo de almacenamiento. Los espermatozoides epididimarios almacenados a 5°C mostraron mejor motilidad y un menor porcentaje de formas anormales que los epidídimos almacenados a temperatura ambiente después de 24 y 48 h. la capacidad de fertilización de los espermatozoides de la cola del epidídimo fue similar que los espermatozoides eyaculados.

Existen también investigaciones en especies exóticas como en el Ciervo Rojo (*Cervus elaphus hispanicus*) realizada por Soler *et al.* (2005), evaluaron la influencia de la prolongación de la refrigeración por 12, 24, 48, 72 y 96 h a 5°C de epidídimos sobre las

características espermáticas después de la congelación. Concluyeron que los espermatozoides congelados–descongelados recuperados de epidídimos almacenados a 5°C tienen un buena calidad espermática (incluido la motilidad) antes de 48 h de almacenamiento para la mayoría de los parámetros espermáticos evaluados.

Por otro lado, Fernández-Santos *et al.* (2006), evaluaron dos experimentos para determinar los efectos del tipo (clarificada y entera) y cuatro concentraciones (0, 5, 10 y 20%) de la yema de huevo, dos concentraciones de glicerol (3, 6%) y dos tasas de enfriamiento de 22 a 5°C (lento: 0.23°C/min; rápido: 4.2°C/min) sobre la supervivencia a la congelación de espermatozoides epididimarios del Ciervo rojo. En conclusión, el uso de yema de huevo clarificada al 20% y glicerol al 6% en combinación con una tasa de enfriamiento rápido, mejoraron significativamente la congelabilidad de los espermatozoides epididimarios del Ciervo rojo.

2.6. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON ESPERMATOZOIDEOS DEL EPIDÍDIMO DE TOROS *POST MORTEM*

La inseminación artificial es la técnica más importante creada para el mejoramiento genético animal, debido a que unos pocos machos seleccionados producen suficientes espermatozoides para inseminar miles de hembras al año. Desde el punto de vista productivo, representa una posibilidad para aumentar la eficiencia en la producción de las especies domesticas (Hafez y Hafez, 2002; Galina, 2008).

La inseminación artificial se define como una técnica mediante la cual es posible, extraer semen a un reproductor, diluirlo y conservarlo, con el propósito de llevarlo al lugar ideal del aparato genital de la hembra a fin de fecundarla, realizándose esto en el momento oportuno y con el instrumento adecuado (Shearer, 2003; Galina, 2008).

La inseminación artificial presenta numerosas ventajas y, como también, desventajas. Las principales ventajas son: a) mejoramiento genético, b) control de enfermedades de transmisión sexual, c) disponibilidad de registros de apareamientos adecuados, d) servicio económico, e) seguridad a través de la eliminación de machos no deseados y f) constituye una herramienta de investigación útil para evaluar muchos aspectos de la fisiología reproductiva del macho y de la hembra. Cuando la inseminación artificial se realiza de manera apropiada, sus desventajas son pocas, en su mayor parte, las desventajas son el resultado de malas técnicas, controles y manejo de los factores que normalmente se consideran ventajosos (Sorensen, 1982; Hafez y Hafez, 2002).

2.6.1. CICLO ESTRUAL Y DETECCIÓN DEL CELO

2.6.1.1. Ciclo estrual

La vaca es poliéstrica y de ovulación espontánea, con una duración del ciclo estrual de 21 días en promedio, con rangos de 14 a 29 días. Durante el ciclo estrual de la vaca ocurren cambios morfológicos, endocrinos y secretorios en ovarios y genitales tubulares (Hafez y Hafez, 2002).

El ciclo estrual se divide en varios periodos, según Sorensen (1982) a los que se denomina proestro, estro, metaestro y diestro: El proestro es de preparación para el apareamiento. El sistema entero se encuentra en un estado de desarrollo y excitación. Se elevan los niveles de estrógeno. En el estro, la vaca está muy excitada interna y externamente y este es el único momento en que aceptará al macho. El nivel de estrógenos es muy alto. En el metaestro la vaca se recupera de la excitación del apareamiento y se prepara para la gestación. Los niveles de estrógenos y progesterona son bajos. Finalmente, en el diestro el animal se encuentra en un periodo latente entre los periodos de excitación sexual. El nivel de progesterona es alto.

2.6.1.2. Detección del Estro

El estro en la vaca dura unas 16 a 18 horas en promedio. Es durante este periodo de libido o urgencia sexual, que la hembra exhibe ciertos indicadores de su receptividad hacia el macho. El toro depende de esas señales, al igual que el ganadero que eligió el método de la inseminación artificial. Los síntomas que se aprecian durante el estro de la vaca, en forma general, son; la vaca consentirá ser montada por otros animales, intentará montar a otras vacas, por lo general se mostrara nerviosa, es muy probable la presencia de moco en la zona del perineo, buscara al toro y permanecerá cerca de este. Siendo el síntoma más importante el reflejo de pasividad de monta o de permanencia (Sorensen, 1982).

La detección eficiente y acertada del estro es esencial cuando se usa inseminación artificial, para lo cual existen diversos métodos; la mayor parte de estros pueden detectarse mediante la observación cuidadosa de las vacas por lo menos dos veces al día, dicha detección se mejora mediante el uso de toros detectores previamente preparados. Otros auxiliares para la detección del estro son indicadores de presión colocados en la grupa de las vacas o en la barbilla o pecho en los toros (Hafez y Hafez, 2002).

2.6.1.3. Momento de la inseminación

El momento universalmente aceptado, es una regla empírica denominada AM – PM. Las vacas cuyo celo se detectan en la mañana, son inseminadas esa misma tarde, y las detectadas en la tarde o noche, se inseminan la mañana siguiente. Se intentó hacer una estimación más precisa, pero la regla AM-PM es muy simple y da buenos resultados, por lo que se le aplica extensamente (Sorensen, 1982).

Al parecer, el momento óptimo de inseminación es 12 a 18 horas después del inicio del celo (Sorensen, 1982).

2.6.2. TÉCNICA DE INSEMINACIÓN

En la vaca, la inseminación artificial se realiza con la técnica recto-vaginal, que consiste en introducir el catéter a través de la vulva hasta la parte más craneal de la vagina, en la cercanía de la os externa del cérvix. Por vía rectal se fija al cérvix con la otra mano y se mueve manteniendo el catéter fijo, hasta que se logra pasar el canal cervical hacia el sitio en donde éste se abre al cuerpo uterino, donde se debe depositar el semen (Galina, 2008).

2.6.3. RESULTADOS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON ESPERMATOZOIDES CONGELADOS-DESCONGELADOS DEL EPIDÍDIMO DE TOROS *POST MORTEM*

Si bien es cierto, existen pocas investigaciones realizadas con respecto a pruebas de fertilidad *in vivo* utilizando la inseminación artificial con espermatozoides congelados (a -196°C) y recuperados de la cola del epidídimo de animales *post mortem*.

Es así, Barker (1954) realizó la inseminación artificial en vacas con espermatozoides del epidídimo de toros *post mortem* congelados a -79°C en ampollas de 1.0 cc. Realizó 10 primeros servicios y un segundo servicio, en los 10 primeros servicios 6 fueron diagnosticadas preñadas por palpación uterina después de 52 días. La vaca con segundo servicio fue diagnosticado preñada. Estos resultados confirmaron una tasa de concepción de 63.6%. Estos resultados mostraban por primera vez que los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de toros muertos y luego congelados tenían capacidad fertilizante.

Seguidamente se han realizado investigaciones en inseminación artificial con espermatozoides refrigerados a 5°C , así como Igboeli y Foote (1968), realizaron una comparación entre el semen eyaculado y epididimal. Los espermatozoides de la cabeza

y cola del epidídimo fueron colectados de 4 toros con previa historia conocida en calidad de semen y fertilidad. Los espermatozoides fueron diluidos a 50×10^6 espermatozoides/mL. Luego fueron refrigerados a 5°C hasta su uso para la inseminación aproximadamente 60 horas después que los toros fueron sacrificados. Cuando los espermatozoides del epidídimo fueron usados en inseminación de 100 vacas, encontraron el 69% de no-retorno dentro de 60 a 90 días. Este valor fue ligeramente inferior que la tasa de no-retorno antes del sacrificio de los toros (75%). Finalmente concluyeron que los espermatozoides de la cola del epidídimo son altamente fértiles.

Por otro lado, Amann y Griel (1974), compararon la fertilidad de espermatozoides del testículo, cola del epidídimo y eyaculado en el bovino. La colección del semen eyaculado de 7 toros fue diariamente por 15 a 25 días previos a la cirugía y los espermatozoides fueron recuperados de un rete testis y por el contralateral vaso deferente mediante canulación. Los espermatozoides fueron diluidos en leche descremada a una concentración de $200 \times 10^6/\text{mL}$. Luego las muestras fueron enfriadas lentamente a 5°C . Las muestras espermáticas fueron usadas 10 a 24 horas después de la colección y dilución. Un total de 141 vaquillas y vacas fueron usadas para comparar la fertilidad. Después de depositar 200×10^6 espermatozoides en cada cuerpo uterino, 106 hembras fueron sacrificadas al día 4 del ciclo Estral natural, el porcentaje de fertilidad de óvulos fue de 0% para los espermatozoides testiculares, 84% para el esperma de la cola del epidídimo y 94% para semen eyaculado. La capacidad de fertilización del esperma de la cola del epidídimo y eyaculado no fue significativamente diferente.

Recientemente Costa *et al.* (2011), publicaron nacimientos de becerros después de la inseminación artificial utilizando espermatozoides obtenidos de epidídimos refrigerados de bovinos muertos. Quienes realizaron la colección de los testículos de un matadero,

una vez en el laboratorio los testículos fueron almacenados a 5°C por 0, 24, 48, 72 horas. Al final de cada periodo los espermatozoides fueron colectados, evaluados y diluidos en Tris-yema de huevo-glicerol (7%) y envasados en pajillas de 0.25mL con una concentración de 15×10^6 espermatozoides, equilibradas a 5°C por 4 horas y congelados a 6 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido a una temperatura de -80 a -120°C por 20 minutos. Las muestras espermáticas correspondientes a los grupos de 24 y 72 horas de almacenamiento fueron usadas en inseminación artificial. Para esto, cuatro pajillas de cada grupo fueron descongelados, mezclados, centrifugados y resuspendidos con Tris-yema de huevo obteniendo una dosis de inseminación de 60×10^6 de espermatozoides totales, con aproximadamente 29×10^6 y 12×10^6 espermatozoides motiles para los grupos 24 y 72 horas, respectivamente, la inseminación se realizó con celo natural después de 12 horas de iniciado el estro. Se inseminó 5 vacas por grupo, un total de 10 vacas. 45 días después las vacas fueron diagnosticadas por ultrasonografía, encontrando dos gestaciones (20%). Aproximadamente 280 días después de la inseminación artificial, observaron el nacimiento de 2 becerros (20%), un becerro por grupo. Reportando por primera vez becerros nacidos a partir de la inseminación artificial utilizando espermatozoides del epidídimo recuperados tres días después de la muerte del reproductor.

Por otro lado, Ehling *et al.*, 2006, para garantizar el mantenimiento de la diversidad genética, se inició un programa de criopreservación de espermatozoides del epidídimo de 109 carneros, que representan 16 razas diferentes dentro de una temporada de cría. Se eligió semen del epidídimo, ya que no era posible la colección de semen a través de la vagina artificial. Antes de la congelación, la motilidad espermática promedio fue de 79,7% y la integridad de acrosoma fue del 93,7%. Después de la congelación, estos niveles se redujeron de 60,5 y 72,8%, respectivamente. En un ensayo de inseminación

con semen de epidídimo congelado-descongelado resultó en una tasa de parición de 87.5%. Los resultados muestran que este método de conservación de semen es eficiente y asociado con altas tasas de fecundidad. También puede ser útil para otras especies.

Así mismo, existen también otros estudios previos realizados sobre la inseminación artificial con espermatozoides congelados de la cola del epidídimo en otras especies, es así como; Garde *et al.* (1998), realizó la IA en 17 hembras de Ciervo Ibérico con espermatozoides del epidídimo criopreservados procedentes de 3 Ciervos machos abatidos. Las hembras fueron previamente sincronizadas con 2 CIDRs (0.33g de progesterona cada uno), inyectándose 300 UI de eCG en el momento de la retirada de los dispositivos. Los animales se inseminaron dos veces (a las 44 y 66 h de la retirada de los CIDRs) por vía vaginal. Las muestras seminales utilizadas fueron de Baja Calidad Inicial (Motilidad individual < 50% y Acrosomas intactos < 75%). Los resultados indican que de las 17 ciervas inseminadas, 4 quedaron gestantes (23.5%) y parieron a los 235±4 días de la inseminación. Pudiendo tener estas observaciones implicaciones muy importantes de cara a la conservación de especies o subespecies de cérvidos en peligro de extinción.

Por su parte, Soler *et al.* (2003), determinaron la fertilidad *in vivo* de espermatozoides del epidídimo congelados-descongelados en 3 machos de la misma especie que los anteriores (ciervo Ibérico), mediante la inseminación artificial intrauterina por laparoscopia en 66 hembras. Previamente las hembras se sincronizaron con CIDR (300mg de progesterona) durante 12 días, administrándose 225 UI de eCG después de la retirada de los CIDRs. Se inseminaron con 100×10^6 de espermatozoides 54 h después de la retirada de los CIDRs. La tasa de fertilidad fue de 56 %, demostrando la capacidad de fertilización de espermatozoides del epidídimo recuperados de animales *post mortem*.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que se encuentra ubicado en el Campus Universitario de la Universidad Nacional del Altiplano–Puno, a una altitud de 3820 m y geográficamente a una Latitud sur de 15°49'34.5" y una longitud oeste de 70° 00' 43.5" (SENAMHI, 2005).

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

Se colectaron 18 pares de testículos de toros criollos adultos, durante los meses de Agosto del 2013 a Enero del 2014, del camal Municipal de la Provincia de el Collao-Ilave. Una vez transportado al laboratorio cada par de testículos fueron almacenadas en refrigeración a 5°C de forma aleatorio durante 0 (n=6), 12 (n=6) y 24 (n=6) h (Cuadro 07).

CUADRO 07. Distribución de pares de testículos de toros criollos adultos para el almacenamiento en refrigeración a 5°C.

Ítems	Tiempo de refrigeración a 5°C.			TOTAL
	0 h	12 h	24 h	
Número de pares				
de	6	6	6	18
testículos/grupo.				

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE TESTÍCULOS

- Los testículos se colectaron con su escroto respectivo, de toros criollos adultos, inmediatamente después del sacrificio.
- El complejo escroto-testículos-epidídimos fue identificado y colocado dentro de una caja de tecnopor para su transporte hacia el laboratorio. El transporte duró entre 2 a 4 horas.
- Una vez en el laboratorio, cada complejo escroto-testículos-epidídimos fueron almacenados de forma aleatoria durante 0, 12 y 24 h a 5°C dentro de una refrigeradora.

3.3.2. COLECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO

Al final de cada periodo de refrigeración se realizó la colección de los espermatozoides de la cola del epidídimo mediante el método descrito por Martins *et al.* (2009), con ciertas modificaciones:

- En primer lugar se procedió a diseccionar y separar de forma aleatoria uno de los testículos del escroto.
- Seguidamente se diseccionó la región de la cola del epidídimo y se separó la cola del epidídimo de la región del cuerpo del epidídimo y del conducto deferente.
- Una vez separado la región de la cola del epidídimo se realizó la fijación del mismo por el borde de inserción con la ayuda de una pinza mosquito.
- Luego se realizó 2 a 3 incisiones en el borde libre de la cola del epidídimo con la ayuda de un bisturí con hoja N° 22 y raspando suavemente en las superficies de

los cortes realizados se dejan caer 2 a 3 gotas de contenido epididimal en un tubo de ensayo de 15 mL que contenía 2 mL de dilutor Tris-yema de huevo precalentado a 35°C. Permaneciendo a esta temperatura durante 10 minutos.

3.3.3. EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS

Las muestras de espermatozoides de todos los grupos, al final de la colección, fueron evaluadas en motilidad total, motilidad progresiva, concentración, vitalidad, morfología, Test Hiposmótico e integridad de acrosoma.

a. Evaluación de la Motilidad Total

- La evaluación de la motilidad total se realizó en un microscopio óptico acoplado con una platina a 37°C a un aumento de 200 a 400X.
- Previamente se dejó calentar láminas portaobjetos y cubreobjetos sobre la platina a 37°C.
- Con la ayuda de una jeringa tuberculina acoplado a un tip de 5µL se aspiró la muestra espermática diluida del tubo de ensayo y se colocó un volumen de 5µl sobre una lámina portaobjetos.
- Seguidamente se cubrió con una laminilla cubreobjetos de 22x22 mm.
- La lectura se realizó en cinco campos diferentes, a las células espermáticas que presentaron cualquier tipo de movimiento.
- Los resultados se expresaron en porcentajes, según la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides mótiles.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

b. Evaluación de la Motilidad Progresiva

- La evaluación de la motilidad progresiva se realizó en un microscopio óptico acoplado con una platina a 37°C a un aumento de 400X de manera similar que la evaluación de la motilidad total.
- La lectura se realizó en cinco campos diferentes, a las células espermáticas que presentaron un movimiento rectilíneo.
- Los resultados se expresaron en porcentaje, según la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides con movimiento rectilíneo.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

c. Evaluación de la concentración espermática

La evaluación de la concentración se realizó mediante el método de Hemocitómetro:

- Con la ayuda de una jeringa acoplado a un tip se aspiró la muestra espermática del tubo de ensayo y se colocó sobre una lámina portaobjeto formando una gota de aproximadamente de 10 μ L.
- Con la pipeta cuenta glóbulos rojos se aspiró los espermatozoides de la gota formada anteriormente hasta la marca 0.5 (ubicado en la parte capilar), luego se aspiró el diluyente espermicida (agua destilada) hasta la señal 101 (que está encima del bulbo de la pipeta).
- La pipeta cuenta glóbulos rojos se tomó entre los dedos índice y pulgar y se agitó suavemente la pipeta en sentido transversal por 2 minutos.
- A continuación se descartó las 5 primeras gotas.
- Se cubrió la cámara de Neubauer con su lámina cubreobjetos y se colocó una gota en cada uno de los ángulos formado por el cubreobjetos para que la muestra

ingrese por capilaridad, se dejó en reposo unos 4 a 5 minutos antes del conteo de espermatozoides.

- Se localizó el área de conteo en un microscopio óptico con un aumento de 100X y se realizó el conteo de espermatozoides a un aumento de 400X.
- Seguidamente el contaje de los espermatozoides se realizó en 5 cuadrados (los cuatro extremos y el del centro) de ambas áreas cuadrículadas de la cámara de Neubauer.
- Una vez obtenido las cifras de espermatozoides en ambas áreas de conteo se calculó el promedio de ambos.
- El número promedio de espermatozoides contados por mm^3 fue multiplicado por los factores de profundidad de cámara y de factor de dilución y luego convertidos a número de espermatozoides por cm^3 , como sigue:
 - Se contaron los espermatozoides de un volumen de $1/50 \text{ mm}^3$
 - El semen se diluyó en una proporción de 1:200.
 - Los espermatozoides/ mm^3 se convierten en cm^3 o en mL.

Por tanto, el número promedio de espermatozoides se multiplicó por:

Número de espermatozoides encontrados

$$\times 50 \times 200 \times 1000 = \text{N}^\circ \text{ de espermatozoides/mL}$$

d. Evaluación de la Vitalidad y Morfología espermática

Se realizó mediante el uso de la tinción de Eosina 5%-Nigrosina 10%, como sigue:

- Se colocó tres láminas portaobjetos sobre una platina térmica a 37°C, con la finalidad de atemperarlos.
- Luego se puso una gota de Eosina al 5% sobre uno de los extremos de una lámina portaobjetos, seguidamente se puso una gota de Nigrosina al 10%.
- Inmediatamente se colocó una gota de semen diluido junto a la gota de Eosina al 5%, mezclándolo cuidadosamente con la ayuda de una aguja hipodérmica y se dejó reposar unos 3 segundos.
- Seguidamente ésta mezcla se volvió a mezclar con la gota de Nigrosina al 10%, que también se deja reposar por otros 3 segundos.
- Luego se hizo un frotis extendiendo la mezcla sobre otra lamina portaobjetos de un extremo al otro, utilizando el borde de otro portaobjetos.
- Inmediatamente después se hizo el secado del frotis sobre la platina a 37°C.
- La evaluación de la vitalidad y morfología espermática se realizó usando un microscopio de contraste de fases a un aumento de 1000X y se realizó el conteo de 200 espermatozoides por muestra analizada.
- Se consideró espermatozoides vivos a aquellos que no presentan coloración y espermatozoides muertos a los que son teñidos de color rosado con el colorante Eosina.
- En cuanto a morfología se consideró espermatozoides normales a aquellos que no presentaban anomalías morfológicas.
- Los resultados se expresaron en porcentaje, según la siguiente ecuación:
- Para vitalidad.

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides sin coloración.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

- Para morfología.

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides normales.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

e. Evaluación del Test Hiposmótico (HOST)

La evaluación del Test Hiposmótico se realizó por el método descrito por Jeyendran *et al.* (1984) con ciertas modificaciones:

- En un tubo de ensayo se colocó 1mL de solución Hipo osmótico (Ver Anexo N° 01) en baño María a 37°C.
- Una vez temperada la solución Hiposmótico se adicionó 0.1 mL de muestra espermática.
- La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min.
- Luego con la ayuda de una jeringa adosada con un tip de 5µL, se aspiró y se colocó una gota de la mezcla sobre una lámina portaobjetos y se cubrió con una lámina cubreobjetos, dejándose reposar por 1 min antes de realizar la evaluación.
- Se observó 100 – 112 espermatozoides en un microscopio de contraste de fase a un aumento de 400X.
- Los espermatozoides con cola enrollada e hinchada se consideraron con reacción positiva.
- Los resultados se expresaron en porcentaje, de la siguiente manera:

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides con cola enrollada e hinchada.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

f. Evaluación de la Integridad de Acrosoma

La evaluación de acrosomas normales se realizó mediante el método descrito por Awad y Graham (2004), con ciertas modificaciones:

- En un tubo de ensayo de 2mL se realizó la adicción de 50µL de muestra seminal en 500µL de Solución citrato de Formalina (96 mL de citrato de sodio al 2.9%; 4 ml de formalina al 37%) y se mezclaron cuidadosamente.
- Con la ayuda de una jeringa adosada con un tip de 5µL, se aspiró y se colocó una gota de la mezcla sobre una lámina portaobjetos y se cubrió con una lámina cubreobjetos, dejándose reposar por 1 min.
- La evaluación de la integridad de acrosoma se realizó mediante el conteo de 200 espermatozoides en un microscopio de contraste de fases a un aumento de 1000X.
- Se consideró espermatozoides con integridad de acrosoma a los que presentaban un borde apical intacto y bien definido y toda alteración en ella se consideró como acrosomas anormales.
- Los resultados se expresaron en porcentajes:

$$\% = \frac{\text{Número de espermatozoides con acrosoma intacto.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

3.3.4. CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE TOROS CRIOLLOS *POST MORTEM*

Este procedimiento se realizó de acuerdo al método descrito por Martins *et al.* (2009), con ciertas modificaciones:

Dilución

Una vez terminada la evaluación de las muestras espermáticas, se procedió a la dilución de las muestras de la siguiente manera:

- En primer lugar se determinó el número de unidades de semen que se pueden procesar, mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de dosis} = \frac{\text{VF} * \text{CE} * \% \text{ MT}}{\text{DSP}}$$

Dónde:

VF : Volumen Fijo que fue 2 mL.

CE : Concentración Espermática.

MT : Motilidad Total.

DSP : Dosis de Semen/pajilla de 0.25 mL.

- Seguidamente se preparó el dilutor Tris – yema de huevo (Ver Anexo N° 02) y se separó en dos fracciones; el primero, que contenía todos los componentes menos el glicerol (Fracción A), la cual se adicionó inmediatamente a la muestra espermática y la segunda fracción contenía, además de todos los componentes, más glicerol al 14% (Fracción B), la que fue adicionada cuando la muestra (fracción A) estuvo a 5 °C.

Enfriamiento

- Inmediatamente después de la adición de la fracción A del dilutor Tris – yema de huevo, la muestra espermática diluida se protegió con un volumen de agua temperada a 37°C, para evitar el choque por frío y se introdujo en una refrigeradora.
- La muestra espermática diluida fue enfriada en forma gradual y lentamente de 37°C hasta 5°C por un periodo de tiempo de 5 horas.
- Una vez alcanzada a la temperatura de 5°C se realizó la adición de la fracción B para completar el volumen total de la dilución y para obtener una dilución final con glicerol al 7%.
- La adición de la fracción B se efectuó en tres partes y muy lentamente y con espacios de cada 15 min.

Envasado de las pajillas de 0.25 mL

- Antes del envasado de las muestras de espermatozoides a las pajillas fueron rotuladas con lapiceros de tinta permanente, en el que se consideró la clave del animal, del tratamiento y la fecha de congelación.
- Las muestras de espermatozoides fueron envasados en pajillas de 0.25 mL con una concentración total de 30×10^6 espermatozoides, ajustados previamente durante la dilución.
- El envasado se realizó haciendo el uso de una jeringa de tuberculina adaptada con tubo de látex del mismo diámetro de la pajilla, haciéndose coincidir el extremo superior de la pajilla con la del tubo látex, luego se introdujo ligeramente el extremo inferior de la pajilla en el tubo colector que contenía a los espermatozoides diluidos y se succionó suavemente hacia la pajilla, se dejó

un espacio de aire entre el tope de la pajilla y la muestra aspirada, para luego aspirar aire con la finalidad de completar el llenado de la pajilla y sellar por el extremo superior de la misma.

- Inmediatamente después se puso en contacto el extremo inferior de la pajilla con Polivinilo de cloruro, luego se sumergió en agua con la finalidad de solidificar el Polivinilo de cloruro y sellar la pajilla.
- Todo el proceso se realizó en un ambiente a 5°C dentro la refrigeradora.

Periodo de equilibrio

- Este periodo se consideró desde que la muestras espermática alcanzó a 5°C hasta su congelación, incluyendo la adicción del glicerol, la cual tuvo una duración de aproximadamente de 1 hora.

Congelación

- Después de terminado el envasado de las pajillas y dejar equilibrar las muestras espermáticas a 5°C, se cargó nitrógeno líquido en una caja de tecnopor graduada un volumen de 2 cm.
- Seguidamente se graduó la gradilla portadora de pajillas a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido.
- A continuación las pajillas fueron secadas y colocadas en posición horizontal sobre la gradilla para la congelación por los vapores de nitrógeno líquido, donde se mantuvieron durante 10 min.
- Finalmente fueron sumergidas directamente en el nitrógeno líquido a -196°C, y almacenadas en el termo criogénico hasta su evaluación post descongelación.

Descongelación

- Se extrajo la pajilla congelada del termo criogénico con la ayuda de una pinza larga, una vez obtenida la pajilla se sumergió inmediatamente en baño María a una temperatura de 37°C por un periodo de 45 s.
- Pasado este tiempo se extrajo la pajilla de baño María, se secó y se traspasó el contenido de la pajilla a un tubo de ensayo temperada a 37°C y contenida en baño María para su posterior evaluación espermática.

3.3.5. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA POST DESCONGELACIÓN

Las muestras espermáticas descongeladas fueron evaluadas en motilidad total, motilidad progresiva, integridad de acrosoma y Test Hipo osmótico, mediante las técnicas descritas anteriormente.

3.3.6. PRUEBA DE FERTILIDAD *IN VIVO* DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO DE TOROS *POST MORTEM*

Para determinar la prueba de fertilidad *in vivo* se realizó mediante la Inseminación Artificial de 13 vacas Brown Swiss del Centro de Investigación y Producción (CIP) de Chuquibambilla.

Momento de la inseminación

El momento de la inseminación se realizó siguiendo la regla empírica denominada AM – PM. Las vacas cuyo celo se detectaron en la mañana, fueron inseminadas esa misma tarde, y las detectadas en la tarde o noche, se inseminaron la mañana siguiente (Sorensen, 1982).

Descongelación de las pajillas

- Se extrajo la pajilla congelada del termo criogénico con la ayuda de una pinza larga, una vez obtenida la pajilla se sumergió inmediatamente en un termo con agua a una temperatura de 37°C por un periodo de 45 s.
- Pasado este tiempo se extrajo la pajilla, se secó y se realizó el montaje en la pistola de inseminación.

Inseminación artificial

La inseminación artificial se realizó con la técnica recto-vaginal, según Galina (2008):

- Se realizó el armado de la pistola de inseminación, mediante el montaje de la pajilla descongelada en el embolo de la pistola, se colocó sobre ésta la funda de inseminación y sobre éste último la camisa de protección, para tener buena higiene.
- Las vacas fueron colocadas en un brete para facilitar el manejo de las mismas.
- Luego se evacuó el estiércol del recto con la mano enguantada, para facilitar la fijación de la cérvix.
- Seguidamente se realizó la limpieza de la región perineal con abundante agua y fue secado con papel toalla.
- Se introdujo el aplicador armado a través de la vulva hasta la parte más craneal de la vagina, cerca del primer anillo cervical.
- Por vía rectal se fijó la cérvix con la otra mano y realizando movimientos suaves y el aplicador fijo, hasta que se logra pasar el canal cervical hacia el sitio en donde éste se abre al cuerpo uterino, donde se depositó el semen.

Evaluación de la fertilidad “*in vivo*”

La fertilidad “*in vivo*” de espermatozoides del epidídimo post descongelados se determinó mediante evaluación ecográfica entre los días 30 – 35 post inseminación.

Para realizar la evaluación ecográfica se usó un Ecógrafo Sonovat 600 con transductor lineal con una frecuencia de 7.5 MHz, realizando los siguientes pasos:

- Se evacuó el estiércol del recto con la mano enguantada para obtener una mejor calidad de la imagen.
- Luego se lubricó el transductor para insertar en el recto.
- Se examinó primero los ovarios, siguiendo por el cuerno uterino, continuando a través del cuerpo del útero continuando con el cuerno contralateral hasta el otro ovario.
- A nivel de los cuernos uterinos se observó la presencia de la vesícula embrionaria en caso positivo de fertilidad.

Los resultados se expresan en tasas de fertilidad de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Fertilidad, \%} = \frac{\text{Número de vacas fertilizadas.}}{\text{Número Total de vacas inseminadas.}} \times 100$$

3.3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la media y la desviación estándar para los diferentes parámetros seminales evaluados, tales como de la concentración espermática, vitalidad, morfología, motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad de acrosoma.

Para determinar el efecto de los diferentes periodos de refrigeración (0, 12 y 24 h) de los epidídimos a 5°C sobre la motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad de acrosoma antes de la congelación y después de la descongelación fueron

evaluados mediante el Análisis de Variancia (ANVA) bajo un diseño Completamente aleatorio, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Las medias de los tratamientos fueron comparadas con el uso de la Prueba de Tukey. Se usó el Software estadístico de SAS (Versión 9.2).

El modelo aditivo lineal del diseño completamente al azar es:

$$\chi_{ij} = \mu_{..} + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, 3$ (periodos de refrigeración de los epidídimos a 0, 12 y 24 h).

$j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ (número de testículos).

Dónde:

χ_{ij} = Variable respuesta; porcentaje de motilidad total y progresiva, porcentaje de espermatozoides reaccionados al test hiposmótico, porcentaje de espermatozoides con integridad de acrosoma.

$\mu_{..}$ = Media poblacional

τ_i = Efecto del i -ésimo periodo de refrigeración

ε_{ij} = Error experimental

Para determinar el efecto de los diferentes periodos de refrigeración de los epidídimos a 5°C sobre la vitalidad espermática, porcentaje de normales y porcentaje de anormales fueron evaluados mediante el estadístico de Ji-cuadrada. Con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Para determinar el efecto de la congelación-descongelación sobre la Motilidad Total, Motilidad Individual, Test Hiposmótico e Integridad de Acrosoma fueron evaluados mediante el estadístico de Ji-cuadrada, siendo la ecuación el siguiente:

$$x^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(\theta_i - e_i)^2}{e_i}$$

Dónde:

$\theta_i = i$ - ésima frecuencia observada.

$e_i = i$ - ésima frecuencia esperada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SOBREVIVENCIA *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO DE TOROS CRIOLLOS *POST MORTEM*

4.1.1. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Los resultados en concentración espermática de muestras seminales obtenidos de epidídimos refrigerados a 5°C en periodos de 0 (0h), 12 (12h) y 24 (24h) h de toros criollos *post mortem* se muestran en la Tabla 01.

TABLA 01. Concentración espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo en tres periodos de refrigeración.

N° de Testículos	Tiempo de refrigeración a 5°C		
	0h (n=6)	12h (n=6)	24h (n=6)
1	310	185	805
2	655	340	130
3	645	810	280
4	1435	380	245
5	890	285	215
6	615	135	360
TOTAL	4550	2135	2035
$\bar{X} \pm S.D.$	758.3 \pm 379.5	355.8 \pm 240.9	339.2 \pm 240.4

Como se puede apreciar en la Tabla 01, se encontró una concentración espermática promedio de 758.3 ± 379.5 , 355.8 ± 240.9 y $339.2 \pm 240.4 \times 10^6$ espermatozoides/mL para los periodos de refrigeración a 0, 12 y 24 h, respectivamente. Se puede observar que la concentración espermática en los periodos de refrigeración a 12 y 24 h son inferiores con respecto al periodo de refrigeración de hora cero (0h), esta diferencia

puede ser atribuida a la variabilidad biológica entre toros (Bertol *et al.*, 2013) y al efecto de la refrigeración.

Así mismo, dentro de cada periodo de refrigeración de los epidídimos, también se encontró una variabilidad alta en la concentración espermática, esto es debido a la variabilidad biológica entre toros (variabilidad individual) y a la variabilidad biológica debido a la función testicular (Albers y Barrios, 2011).

Los resultados del presente trabajo de investigación muestran diferencias con respecto a los resultados publicados por Martins *et al.* 2007 (440×10^6 espermatozoides/cada epidídimo) y Martins *et al.* 2009 ($432 \pm 77 \times 10^6$ espermatozoides/mL) en toros cruzados *post mortem*, quienes utilizaron el mismo método de recuperación de espermatozoides a partir de la cola del epidídimo, donde la concentración espermática encontrada a 0 h es superior a ambos reportes pero las concentraciones espermáticas encontradas a 12 y 24 h son inferiores a los mismos. Tal diferencia podría atribuirse al efecto del periodo de refrigeración de los epidídimos, así como a la diferencia por efecto de raza.

Mientras Albers y Barrios (2011) en toros cebús encontraron concentraciones muy superiores de 5.32×10^8 espermatozoides/mL. Esta diferencia es debida probablemente al efecto de método de colección de espermatozoides a partir de la cola del epidídimo, quienes usaron el método de lavado por flujo retrógrado, el cual garantiza una mayor concentración espermática (Bertol *et al.*, 2013).

4.1.2. VITALIDAD Y MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

La vitalidad y morfología espermática fueron evaluadas solamente antes de la congelación y los resultados obtenidos en vitalidad de los espermatozoides obtenidos de epidídimos refrigerados a 5°C por periodos de 0, 12 y 24 h de toros criollos *post mortem* se muestran en la Tabla 02.

TABLA 02. Vitalidad (%) de espermatozoides de la cola del epidídimo en tres periodos de refrigeración antes de la congelación.

N° de Testículos	Tiempo de refrigeración a 5°C		
	0h (n=6)	12h (n=6)	24h (n=6)
1	66.0377	75.2381	90.9091
2	78.7037	84.2105	72.1154
3	81.5789	57.7778	65.0000
4	81.6092	71.6312	72.9730
5	83.1683	71.9626	73.5849
6	76.1905	78.9474	71.8750
TOTAL	467.2884	439.7676	446.4574
$\bar{X} \pm S.D.$	77.88 \pm 6.31	73.29 \pm 8.95	74.41 \pm 8.66

Como se puede observar en la Tabla 02, los resultados en vitalidad espermática fueron en promedio de 77.88 \pm 6.31, 73.29 \pm 8.95 y 74.41 \pm 8.66% en los periodos de refrigeración a 0, 12 y 24 h, respectivamente, los cuales no muestran diferencias significativas entre los periodos de refrigeración de los epidídimos a 5°C ($p > 0.05$), según el estadístico de Ji-cuadrada (Anexo 04). Lo cual indica que la refrigeración de los epidídimos por 24 h mantiene estable la vitalidad espermática sin cambios significativos.

Estos resultados son confirmados por Martins *et al.* (2009), quienes encontraron que la vitalidad espermática se mantenía estable después de 72 h de refrigerar los epidídimos a 5°C, cuyos resultados fueron de 75.5 ± 4.0 , 72.3 ± 17.5 , 70.7 ± 12.4 y $64.0 \pm 15.4\%$ a 0, 24, 48, 72 h de refrigeración a 5°C, respectivamente. Así mismo, Gutiérrez *et al.* (2004b) encontraron una vitalidad de $76.04 \pm 6.95\%$, en la cual 48 pares de testículos fueron colectados aproximadamente 15 min después de la muerte de los toros y fueron transportados al laboratorio del matadero en neveras a 5°C por 1 a 4 h, cuyos resultados son similar con respecto a los resultados de vitalidad del presente trabajo de investigación. En cambio, Gutiérrez *et al.* (2004a) encontraron en toros *post mortem* una vitalidad de los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo inferior a los resultados del presente trabajo de investigación ($57.92 \pm 16.99\%$), inclusive comparando con los resultados después de 12 y 24 h de refrigeración. Lo que demuestra que la refrigeración de epidídimos es una alternativa para conservar la calidad espermática por periodos extensos.

Por otro lado, en investigaciones realizadas en búfalos por Harshan *et al.* (2006) y Singh *et al.* (2007) encontraron tasas de viabilidad espermática superiores a los resultados del presente estudio (83.92 ± 0.8 , y $83.6 \pm 0.9\%$ respectivamente), la cual puede ser debido a la diferencia por efecto especie.

Los resultados en morfología de espermatozoides obtenidos de epidídimos refrigerados a 5°C por periodos de 0, 12 y 24 h de toros criollos *post mortem* se muestran en la Tabla 03 (Anexo 02).

TABLA 03. Morfología de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo en tres periodos de refrigeración antes de la congelación.

Característica.	Tiempo de refrigeración a 5°C		
	0h (n=6)	12h (n=6)	24h (n=6)
Normales (%)	71.72 ± 3.50	64.92 ± 13.92	65.99 ± 7.52
Anormalidades Totales (%)	28.28 ± 3.50	35.08 ± 13.92	34.01 ± 7.52
<i>Anormalidades Primarias (%)</i>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Anormalidades Secundarias (%)</i>	28.28 ± 3.50	35.08 ± 13.92	34.01 ± 7.52
Gota proximal (%)	0.60 ± 0.74	0.32 ± 0.49	0.79 ± 1.27
Cabeza Libre (%)	0.71 ± 0.86	1.36 ± 2.06	0.47 ± 0.52
Gota distal (%)	17.09 ± 3.60	19.22 ± 10.78	17.26 ± 6.00
Anormalidades de la cola (%)	9.88 ± 2.80	14.19 ± 7.81	15.50 ± 5.24

Los resultados en el porcentaje de espermatozoides normales para los periodos de refrigeración a 0, 12 y 24 h fueron de 71.72 ± 3.50, 64.92 ± 13.92 y 65.99 ± 7.52 %, respectivamente. Los cuales no muestran diferencias significativas entre los periodos de refrigeración de los epidídimos a 5°C ($p>0.05$), según el estadístico de Ji-Cuadrada (Anexo 04). Estos resultados indican que la refrigeración de los epidídimos a 5°C por 24 h no afectó la morfología de los espermatozoides.

Aunque no existen investigaciones realizadas en la evaluación de espermatozoides normales obtenidas de epidídimos refrigerados por periodos largos a 5°C, en una investigación realizada en toros *post mortem* por Gutiérrez *et al.* (2004b), encontraron 64.77±14.16% de espermatozoides normales, quienes transportaron los testículos del

camal al laboratorio en neveras a 5°C por 1 a 4 h, cuyo resultado es ligeramente menor en comparación con el resultado del periodo de refrigeración a hora cero (0 h), pero es similar con respecto a periodos de refrigeración a 12 y 24 h.

Por otro lado, en toros cebús *post mortem* Albers y Barrios (2011) encontraron 42.76 y 39.79% de espermatozoides normales bajo dos protocolos de transporte de los testículos al laboratorio (35°C y 25°C respectivamente), los cuales son menores con respecto a los resultados del presente estudio. Esta diferencia se debería posiblemente al efecto especie.

Los resultados en el porcentaje de anormalidades totales en espermatozoides de la cola del epidídimo como se pueden observar en la Tabla 03 fueron en promedio de 28.28 ± 3.50 , 35.08 ± 13.92 y 34.01 ± 7.52 % para los periodos de refrigeración a 0, 12 y 24 h, respectivamente. Los cuales no muestran diferencias significativas entre los periodos de refrigeración de los epidídimos a 5°C ($p > 0.05$), según el estadístico de Ji-Cuadrada (Anexo 04). Estos resultados muestran altos porcentajes de espermatozoides anormales en los tres periodos de refrigeración, en especial se encontró una mayor proporción de anormalidades secundarias, dentro de estas la mayor proporción de anormalidades fueron la presencia de gotas citoplasmáticas distal y anormalidades de la cola.

Martins *et al.* (2009) reportaron una anormalidad total de 36.68%, con presencia de 26.62% de gotas citoplasmáticas distales. La cual es similar con respecto a los resultados del presente estudio, con excepción de que encontraron una mayor presencia de gotas citoplasmáticas.

En otra investigación realizada por Albers y Barrios (2011) en toros cebús, encontraron tasas de anormalidades de 57.22 y 60.2% para dos protocolos de transporte

de testículos (35°C y 25°C), donde las anormalidades secundarias fueron de 50.76 y 54.21%, respectivamente y de estas las anormalidades mayoritariamente fueron la presencia de anormalidades de la cola (30.09 y 29.87%) y gota citoplasmática distal (14.95 y 14.96%). Cuyos resultados muestran un similar porcentaje de gotas citoplasmáticas distales con respecto a los resultados del presente estudio, pero encontraron una mayor proporción de anormalidades de la cola, la que podría ser debida a la diferencia de especies y al manejo de los espermatozoides al momento de la evaluación.

En cambio, Martins *et al.* (2007) evaluaron muestras espermáticas epididimarias de 3 toros cruzados *post mortem*, encontrando tasas de anormalidades superiores para todos los toros de 54, 48, 40 %, respectivamente, donde mayoritariamente fueron observadas las gotas citoplasmáticas distal y anormalidades de la cola. Esta diferencia puede deberse al efecto raza.

Los resultados del presente trabajo de investigación también pueden ser reforzados por Kaabi *et al.* (2003), quienes realizaron una investigación en ovinos encontrando que el porcentaje de anormalidades totales no incrementó cuando los epidídimos fueron almacenados a 5°C por 48 h, en cambio los epidídimos almacenados a temperatura ambiente (22°C) mostraron un incremento en anormalidades espermáticas después de 24 h, lo que podría indicar que la refrigeración de los epidídimos mantiene la morfológica de los espermatozoides.

Estos resultados observados explican que la alta presencia de gota citoplasmática distal se debería a que la pérdida de las gotas se produce al momento de la eyaculación, cuando los espermatozoides entran en contacto con el fluido de la vesícula seminal, el cual tendría un efecto de remoción (factor hemolítico) de la gota citoplasmática (Bart y

Oko, 1989). Lo cual indica que la presencia de gota citoplasmática distal en espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo es considerado como normal (Bertol *et al.*, 2013). Con respecto al alto porcentaje de anomalías en la cola del espermatozoide estarían afectados por la presencia o no del diluyente, es decir, si la fijación de la muestra se realiza antes de añadir el diluyente, se observa un menor porcentaje de anomalías en la cola debido supuestamente a una menor tasa de cambios osmóticos en el medio (Stachecki *et al.*, 1993; Lenguinat y Blottner, 1994).

4.1.3. MOTILIDAD TOTAL

Los resultados sobre el porcentaje de motilidad total antes de la congelación y después de la descongelación, de espermatozoides obtenidos de epidídimos refrigerados a 0, 12 y 24 h de toros criollos *post mortem* se muestran en la Tabla 04.

TABLA 04. Motilidad Total (%) de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo antes de la congelación y después de la descongelación.

N° de testículos	Tiempo de refrigeración a 5°C					
	0h (n=6)		12h (n=6)		24h (n=6)	
	Antes*	Después†	Antes	Después	Antes	Después
1	92.0000	57.4257	78.9157	28.4404	52.4017	33.0435
2	80.3738	61.1429	68.6667	20.8531	83.4711	22.0126
3	90.1786	63.8743	62.1145	22.3684	83.8150	24.8619
4	85.9060	22.0641	86.9231	39.0698	59.8616	26.1538
5	64.4068	41.0448	64.5022	25.8065	59.5455	25.1309
6	67.5000	50.0000	85.4651	21.8935	82.3864	18.3267
TOTAL	480.3652	295.5518	446.5872	158.4316	421.4813	149.5294
$\bar{X} \pm S.D.$	80.06±11.68	49.26±15.68 ^a	74.43±10.78	26.41±6.82 ^b	70.25±14.47	24.92±4.89 ^b

Letras diferentes superpuestas indican diferencias ($p \leq 0.05$) entre periodos de refrigeración.

*Antes: antes de la congelación.

†Después: después de la descongelación.

Se encontraron una motilidad total antes de la congelación en promedio de 80.06 ± 11.68 , 74.43 ± 10.78 y 70.25 ± 14.47 % y después de la descongelación de 49.26 ± 15.68 , 26.41 ± 6.82 y 24.92 ± 4.89 % en los periodos de refrigeración a 0, 12 y 24 h, respectivamente. Los datos obtenidos en motilidad total fueron analizados mediante el ANVA antes de la congelación y después de la descongelación para determinar el efecto de la refrigeración de los epidídimos (Anexo 03). Como se puede apreciar en la Tabla 04, antes de la congelación no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los periodos de refrigeración en motilidad total. Pero después de la descongelación se encontró una diferencia altamente significativa ($p \leq 0.05$) entre los periodos de refrigeración.

Para determinar el efecto de la congelación y descongelación sobre la motilidad total se utilizó el estadístico de Ji-Cuadrada, en la cual se encontró una diferencia altamente significativa en todos los periodos de refrigeración ($p \leq 0.05$) (Anexo 05). Estos resultados muestran que antes de la congelación la refrigeración de los epidídimos mantiene estable la motilidad total después de 24 h. Sin embargo, después de la descongelación se encontró que la motilidad total fue afectada por efecto del periodo de refrigeración, así mismo fue afectada por efecto de la congelación-descongelación.

Martins *et al.* (2009), encontraron que la motilidad total se preservó después de 24 h de refrigeración de los epidídimos a 5°C (78.1 ± 10.2 , 67.8 ± 7.5 , 60.4 ± 11.7 y 56.6 ± 10.3 % para 0, 24, 48 y 72 h, respectivamente), pero después de la descongelación encontraron que la motilidad total fue afectada no solamente por el proceso de la congelación, sino también por efecto del periodo de refrigeración (51.6 ± 11.6 , 45.0 ± 20.2 , 40.0 ± 18.2 y 24.1 ± 13.5 %, respectivamente). Cuyos resultados son similares a los resultados del presente trabajo de investigación en motilidad total antes de la congelación, pero después de la descongelación obtuvieron mejores tasas de

recuperación. Tal superioridad a la descongelación, se debe probablemente al efecto protector de la yema de huevo, quienes utilizaron una concentración del 25 %, que en caso del presente estudio se utilizó una concentración del 10%, lo cual puede ejercer una mayor protección espermática frente al shock por frío y también conferir mayor protección durante la congelación y descongelación (Fernandez-Santos *et al.* 2006). Otra de las causas de esta diferencia también puede deberse al efecto del periodo de equilibrio y tasa de congelación, quienes equilibraron por 4 h a 5°C y congelaron en vapores de nitrógeno entre - 80 y - 120°C durante 20 min, que en caso del presente trabajo tuvo un periodo de equilibrio de 1 h y se congeló a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido por 10 min, sin conocer ni controlar la temperatura de congelación, ya que se recomienda un tiempo óptimo de equilibrio de 4 a 6 h la que podría conferir una mayor adaptación espermática a bajas temperaturas y por tanto, exista una mayor tasa de recuperación espermática a la descongelación (Hafez y Hafez, 2002; Muiño, 2008).

Los resultados del presente trabajo de investigación también pueden ser corroboradas por Bertol *et al.* (2013) quienes realizaron la colección de espermatozoides de epidídimos almacenados a temperatura ambiente (18 - 22°C) de toros *Bos Taurus indicus* por 6, 12, 18, 24 y 30 h, donde el porcentaje de motilidad respectivamente fue de 67.5 ± 11.9 , 66.25 ± 7.5 , 67.5 ± 2.8 , 58.75 ± 8.5 y 41.25 ± 7.5 . Encontrándose que el porcentaje de motilidad no disminuyó significativamente a las 24 h de almacenamiento de los epidídimos. Sin embargo, en comparación con los resultados del presente trabajo se encontró un mejor porcentaje de motilidad total antes de la congelación, lo que podría indicar que la motilidad espermática se preserva mejor en refrigeración de los epidídimos a 5°C que a temperatura ambiente.

De la misma manera en ovinos reportaron (Kaabi *et al.*, 2003) que la motilidad no fue afectada por el periodo de refrigeración durante 24 h de almacenamiento de

epidídimos a 5°C (80.3 ± 0.7 , 78.4 ± 1.3 y 64.4 ± 2.7 para 0, 24 y 48 h), pero si fue afectado negativamente por la congelación y descongelación (69.8 ± 1.0 , 64.6 ± 1.6 y 48.7 ± 3.2 , respectivamente).

En otras investigaciones realizadas en otros rumiantes, como en ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) por Soler *et al.* (2005), no encontraron diferencia significativa en el porcentaje de motilidad individual por 96 h de refrigeración de los epidídimos a 5°C antes de la congelación y cuando los espermatozoides de epidídimos refrigerados fueron congelados la motilidad no fue afectada durante 24 h de refrigeración de los epidídimos, ni por efecto de la congelación ni por efecto de la refrigeración de los epidídimos. Tal diferencia puede atribuirse a la protección de yema de huevo, por cuanto ellos utilizaron una concentración del 20%. Lo cual también puede ser apoyada por Fernández-Santos *et al.* (2006), quienes a una concentración del 20% de yema de huevo encontraron mejores tasas de motilidad antes y después de la congelación.

4.1.4. MOTILIDAD PROGRESIVA

Los resultados sobre el porcentaje de motilidad progresiva antes de la congelación y después de la descongelación, de espermatozoides obtenidos de epidídimos refrigerados a 0, 12 y 24 h de toros criollos *post mortem* se muestran en la Tabla 05.

TABLA 05. Motilidad Progresiva (%) de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo antes de la congelación y después de la descongelación.

N° de testículos	Tiempo de refrigeración a 5°C					
	0h (n=6)		12h (n=6)		24h (n=6)	
	Antes*	Después [†]	Antes	Después	Antes	Después
1	59.4937	16.3265	46.8354	10.8014	16.7702	15.0000
2	44.4444	28.7037	36.4407	9.3633	40.0000	12.0805
3	49.1935	21.1765	43.0769	10.0806	31.2057	9.5890
4	41.8301	14.6939	51.9313	20.8333	27.9461	12.5000
5	27.8846	15.9664	23.0769	13.0890	26.2774	10.9489
6	45.6897	20.5357	23.0769	11.1111	43.6464	7.0270
TOTAL	268.5360	117.4027	224.4382	75.2788	185.8458	67.1455
$\bar{X} \pm S.D.$	44.76±10.31	19.57±5.18 ^a	37.41±12.20	12.55±4.25 ^b	30.97±9.75	11.19±2.72 ^b

Letras diferentes superpuestas indican diferencias ($p \leq 0.05$) entre periodos de refrigeración.

*Antes: antes de la congelación.

[†]Después: después de la descongelación.

Los resultados obtenidos en motilidad progresiva antes de la congelación en promedio fue de 44.76 ± 10.31 , 37.41 ± 12.20 y 30.97 ± 9.75 % y después de la descongelación de 19.57 ± 5.18 , 12.55 ± 4.25 y 11.19 ± 2.72 % en los periodos de refrigeración a 0, 12 y 24 h, respectivamente. Los datos obtenidos en motilidad progresiva fueron analizados mediante el ANVA antes de la congelación y después de la descongelación para determinar el efecto de la refrigeración de los epidídimos (Anexo 03). Como se puede apreciar en la Tabla 05, antes de la congelación no se

encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre los periodos de refrigeración en motilidad progresiva. Sin embargo, después de la descongelación se encontró una diferencia altamente significativa ($p\leq 0.05$) entre los periodos de refrigeración.

Para determinar el efecto de la congelación y descongelación sobre la motilidad progresiva se utilizó el estadístico de Ji-Cuadrada, en la cual se encontró una diferencia altamente significativa en todos los periodos de refrigeración ($p>0.05$) (Anexo 05). Estos resultados muestran que la refrigeración de los epidídimos mantiene estable la motilidad progresiva después de 24 h antes de la congelación. Sin embargo, después de la descongelación se encontró que la motilidad progresiva fue afectada por efecto del periodo de refrigeración, así mismo fue afectada por efecto de la congelación-descongelación en todos los periodos de refrigeración.

Martins *et al.* (2009), reportaron en toros cruzados *post mortem* que la motilidad progresiva se preservó después de 72 h de refrigeración de epidídimos a 5°C, estos resultados fueron expresados en vigor (3.2 ± 0.5 , 2.9 ± 0.6 , 3.1 ± 0.3 y 2.8 ± 0.8 para 0, 24, 48 y 72 h), la cual además no fue afectada después de la descongelación ni por efecto de la refrigeración ni por efecto del proceso de la congelación (2.6 ± 0.5 , 2.7 ± 0.4 , 2.7 ± 0.5 y 2.6 ± 0.5 , respectivamente). Cuyos resultados son mayores a los resultados del presente estudio en motilidad progresiva antes de la congelación y después de la descongelación. Tal superioridad a la descongelación, se puede atribuirse al efecto protector de la yema de huevo, quienes utilizaron una concentración del 25 %. Otra de las causas de diferencia también puede deberse al efecto del periodo de equilibrio y tasa de congelación.

Mientras Gutiérrez *et al.* (2004b) que colectaron los testículos 3 a 4 h después de la muerte de los animales, donde a la evaluación obtuvieron una motilidad progresiva

superior a los resultados del presente trabajo antes de la congelación ($59.16 \pm 10.58\%$) y después de la descongelación (35.83 ± 11.77), aunque también encontraron diferencia significativa ($p < 0.05$) de la motilidad progresiva antes y después de la congelación. Lo que indica que el efecto nocivo de la congelación fue mayor en el presente trabajo de investigación. Tal diferencia puede atribuirse al efecto de la concentración de yema de huevo, quienes utilizaron una concentración de 25%, además realizaron un periodo de equilibrio de 2 h a 5°C , la cual es 1 h más que el presente trabajo, la congelación lo realizaron a 10 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido en el tanque por 10 min. Así mismo la congelación lo realizaron en pajillas de 0.5 mL, que en caso del presente trabajo se realizó en pajillas de 0.25 mL de volumen el cual garantiza una congelación homogénea, pero al mismo tiempo es propenso a sufrir cambios de temperatura que las pajillas de 0.5 mL (Stevenson *et al.*, 2009).

De la misma manera en ovinos reportaron (Kaabi *et al.*, 2003) que la motilidad progresiva no fue afectada por el periodo de refrigeración antes de la congelación y después de la descongelación durante 24 h de almacenamiento de epidídimos a 5°C (68.4 ± 1.0 , 64.7 ± 2.7 y 52.4 ± 3.8 para 0, 24 y 48 h), pero si fue afectado negativamente por la congelación y descongelación (55.8 ± 1.0 , 48.8 ± 2.3 y 30.7 ± 2.3 , respectivamente). Esta diferencia puede atribuirse al efecto especie.

Por otro lado, investigaciones realizadas en búfalos (Harshan *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007) encontraron que la motilidad progresiva se redujo significativa debido al efecto de la congelación. Sin embargo, estos resultados son superiores en comparación con los resultados del presente trabajo. Tal diferencia podría atribuirse al efecto especie.

4.1.5. TEST HIPOSMÓTICO (HOST)

Los resultados de la evaluación del test hiposmótico para determinar la integridad funcional de la membrana espermática de espermatozoides obtenidos de epidídimos refrigerados a 5°C por periodos de 0, 12 y 24 h se muestran en la Tabla 06.

TABLA 06. Test hiposmótico (%) de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo antes de la congelación y después de la descongelación.

Nº de testículos	Tiempo de refrigeración a 5°C					
	0h (n=6)		12h (n=6)		24h (n=6)	
	Antes*	Después†	Antes	Después	Antes	Después
1	77.3109	56.3707	76.3636	32.5000	60.2041	34.5455
2	71.8182	48.5294	66.6667	29.8387	65.6000	24.7423
3	73.5043	60.8911	65.9091	27.3585	68.2927	23.5294
4	74.2188	56.3218	67.1533	42.8571	50.8929	32.7869
5	59.8870	46.4286	63.2479	36.0294	50.5263	24.2188
6	61.6071	50.7463	67.8899	23.3333	66.3717	25.0000
TOTAL	418.3463	319.2878	407.2305	191.9171	361.8876	164.8228
$\bar{X} \pm S.D.$	69.72±7.20	53.21±5.53	67.87±4.46	31.99±6.87	60.31±7.91	27.47±4.86

Letras diferentes superpuestas indican diferencias ($p \leq 0.05$) entre periodos de refrigeración.

*Antes: antes de la congelación.

†Después: después de la descongelación.

Los resultados en test hiposmótico de los espermatozoides de la cola del epidídimo antes de la congelación en promedio fue de 69.72 ± 7.20 , 67.87 ± 4.46 y 59.51 ± 7.13 % y después de la descongelación de 53.21 ± 5.53 , 31.99 ± 6.87 y 27.47 ± 4.86 % en los periodos de refrigeración a 0, 12 y 24 h, respectivamente. Los datos obtenidos de espermatozoides reaccionados positivamente al test hiposmótico fueron analizados mediante el ANVA antes de la congelación y después de la descongelación para determinar el efecto de la refrigeración de los epidídimos (Anexo 03). Como se puede

apreciar en la Tabla 06, antes de la congelación no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre los periodos de refrigeración en espermatozoides reaccionados positivamente al test hiposmótico. Pero después de la descongelación se encontró una diferencia altamente significativa ($p\leq 0.05$) entre los periodos de refrigeración.

Para determinar el efecto de la congelación y descongelación sobre espermatozoides reaccionados positivamente al test hiposmótico se utilizó el estadístico de Ji-Cuadrada (Anexo 05), en la cual no se encontró una diferencia significativa en el periodo de refrigeración a 0 h ($p>0.05$) pero si se encontró una diferencia altamente significativa en los periodos de refrigeración a 12 y 24 h ($p\leq 0.05$). Estos resultados evidencian que la refrigeración de los epidídimos preserva la integridad funcional de la membrana espermática por 24 h antes de la congelación, pero después de la descongelación es afectado por efecto del periodo de refrigeración. Así mismo, no fue afectada por efecto de la congelación-descongelación en el periodo de refrigeración a 0 h, sin embargo si fue afectada en los periodos de refrigeración a 12 y 24 h.

No se encontró investigaciones previas en toros con respecto a la evaluación del test hiposmótico de espermatozoides obtenidos a partir de epidídimos refrigerados a 5°C.

En una investigación realizada en espermatozoides de toros muertos obtenidos de la cola de epidídimos por Ribeiro-Peres *et al.* (2014), quienes congelaron por métodos convencional y automatizado, no encontraron diferencia significativa por efecto de la congelación mediante el método de congelación convencional ($69.7\pm 9.2\%$ y $60.2\pm 13.6\%$). Cuyos resultados de la integridad funcional de la membrana es similar a los resultados del presente trabajo en comparación con el periodo de refrigeración a 0 h, con la diferencia que a la descongelación presenta un mayor porcentaje de espermatozoides funcionales en comparación con los periodos de 12 h y 24 h. Esta

diferencia después de la descongelación puede deberse probablemente al método de congelación, quienes realizaron con un periodo de equilibrio a 4°C por 4 h y luego fueron congelados a 6 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido por 20 minutos en pajillas de 0.5 mL. Un mayor tiempo de equilibrio podría garantizar una mayor adaptación de los espermatozoides a bajas temperaturas y por tanto una mayor tasa de recuperación espermática a la descongelación (Hafez y Hafez, 2002; Muiño, 2008).

En cambio, una investigación similar fue realizada en ovinos por Kaabi *et al.* (2003), quienes confirman, aunque encontraron mejores tasas de espermatozoides reaccionados, que la integridad funcional de la membrana espermática se mantiene estable durante 24 h de refrigeración de los epidídimos, pero de la misma manera fue influenciada significativamente por efecto del proceso de la congelación mas no por efecto del periodo de refrigeración. Lo mismo reportaron Soler *et al.* (2005) en el ciervo Ibérico, quienes a la descongelación no encontraron diferencia significativa de la integridad funcional de la membrana espermática por efecto de periodo de tiempo de refrigeración y se mantuvo estable inclusive por periodos de refrigeración a 5°C por 96 h. Estos resultados indican que la viabilidad de los espermatozoides obtenidos de epidídimo refrigerados de animales muertos se mantiene estable después de la descongelación.

Con relación a los porcentajes mínimos de aceptación, se recomienda después de la descongelación mínimamente 40% de espermatozoides reaccionados en semen eyaculado (Curbelo y Rodríguez, 2013). Lo cual es comparable con el porcentaje de espermatozoides reaccionados en el periodo de refrigeración a hora cero (0 h), sin embargo, los porcentajes de espermatozoides reaccionados a 12 y 24 h son muy inferiores y no cumplen a tal recomendación.

4.1.6. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ACROSOMA

Los resultados sobre la evaluación de integridad de acrosoma de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo refrigerados a 5°C por periodos de 0 h, 12 h y 24 h se muestran en la Tabla 07.

TABLA 07. Integridad de Acrosoma (%) de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo antes de la congelación y después de la descongelación.

N° de testículos	Tiempo de refrigeración a 5°C					
	0h (n=6)		12h (n=6)		24h (n=6)	
	Antes*	Después [†]	Antes	Después	Antes	Después
1	62.4390	48.2927	70.0000	31.0000	55.2239	36.6337
2	60.5911	46.7662	67.9612	22.1675	67.3171	21.3930
3	76.6169	56.7164	65.1741	22.7723	59.6154	17.5000
4	61.5000	45.8537	61.2745	39.0000	53.4653	26.5000
5	54.4554	43.8424	60.5911	35.2941	52.5000	22.0000
6	57.5000	48.5000	64.0000	23.1884	68.9655	19.2118
TOTAL	373.1025	289.9713	389.0009	173.4223	357.0872	143.2385
$\bar{X} \pm S.D.$	62.18±7.66	48.33±4.45 ^a	64.83±3.69	28.90±7.25 ^b	59.51±7.13	23.87±6.95 ^b

Letras diferentes superpuestas indican diferencias ($p \leq 0.05$) entre periodos de refrigeración.

*Antes: antes de la congelación.

[†]Después: después de la descongelación.

Los resultados obtenidos en integridad de acrosoma antes de la congelación en promedio fue de 62.18±7.66, 64.83±3.69 y 59.51±7.13 % y después de la descongelación de 48.33±4.45, 28.90±7.25 y 23.87±6.95 % en los periodos de refrigeración a 0, 12 y 24 h, respectivamente. Los datos obtenidos en integridad de acrosoma fueron analizados mediante el ANVA antes de la congelación y después de la descongelación para determinar el efecto de la refrigeración de los epidídimos (Anexo

03). Como se puede apreciar en la Tabla 07, antes de la congelación no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los periodos de refrigeración en integridad de acrosoma. Pero después de la descongelación se encontró una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los periodos de refrigeración.

Para determinar el efecto de la congelación y descongelación sobre la integridad de acrosoma se utilizó el estadístico de Ji-Cuadrada (Anexo 05), en la cual no se encontró una diferencia significativa en el periodo de refrigeración a 0 h ($p > 0.05$), pero si se encontró una diferencia significativa en los periodos de refrigeración a 12 y 24 h ($p \leq 0.05$). Estos resultados evidencian que la refrigeración de los epidídimos preserva la integridad de acrosoma espermática por 24 h antes de la congelación, pero después de la descongelación fue afectado por efecto del periodo de refrigeración. Así mismo, no fue afectada por efecto de la congelación-descongelación en el periodo de refrigeración a 0 h, sin embargo en los periodos de refrigeración a 12 y 24 h si fue afectada por efecto de la congelación y descongelación.

Estos resultados muestran un mismo patrón de comportamiento con respecto a los resultados publicados por Martins *et al.* (2009), encontraron que la integridad de acrosoma se mantuvo estable por 72 h de almacenamiento a 5°C, de la misma manera a la descongelación fue afectada tanto por el proceso de la congelación como también por el periodo de tiempo de almacenamiento de los epidídimos. En otro estudio realizado en toros por Martins *et al.* (2007), quienes colectaron los espermatozoides de la cola de epidídimos 7 h después de la muerte de los animales. También encontraron diferencias significativas por efecto de la congelación, pero con mejores tasas de integridad de acrosoma, la cual es debido posiblemente a la concentración de yema de huevo que utilizaron (25%), ya que está bien reconocido que la yema de huevo preserva la integridad de acrosoma del espermatozoides congelado descongelado, es así que

Fernández-Santos *et al.* (2006) encontraron que este parámetro es significativamente inferior en un dilutor sin yema de huevo.

Mientras Gutiérrez *et al.* (2004b) no encontró diferencia significativa por efecto de la congelación y descongelación (75.54 ± 9.99 y $71.54 \pm 11.87\%$). Lo cual puede deberse al uso de una concentración de yema de huevo del 25%, lo que podría ejercer una mayor protección del acrosoma espermático.

Harshan *et al.*, 2006 y Singh *et al.*, 2007 en búfalos, también encontraron el efecto de la congelación sobre la integridad de acrosoma, aunque en menor proporción en comparación con otras características seminales, las cuales fueron antes de la congelación de 80.42 ± 0.82 y 80.2 ± 1.08 y después de la descongelación de 66.83 ± 1.05 y 71.8 ± 1.08 %, respectivamente. Esta diferencia, en especial a la descongelación, puede deberse al factor especie.

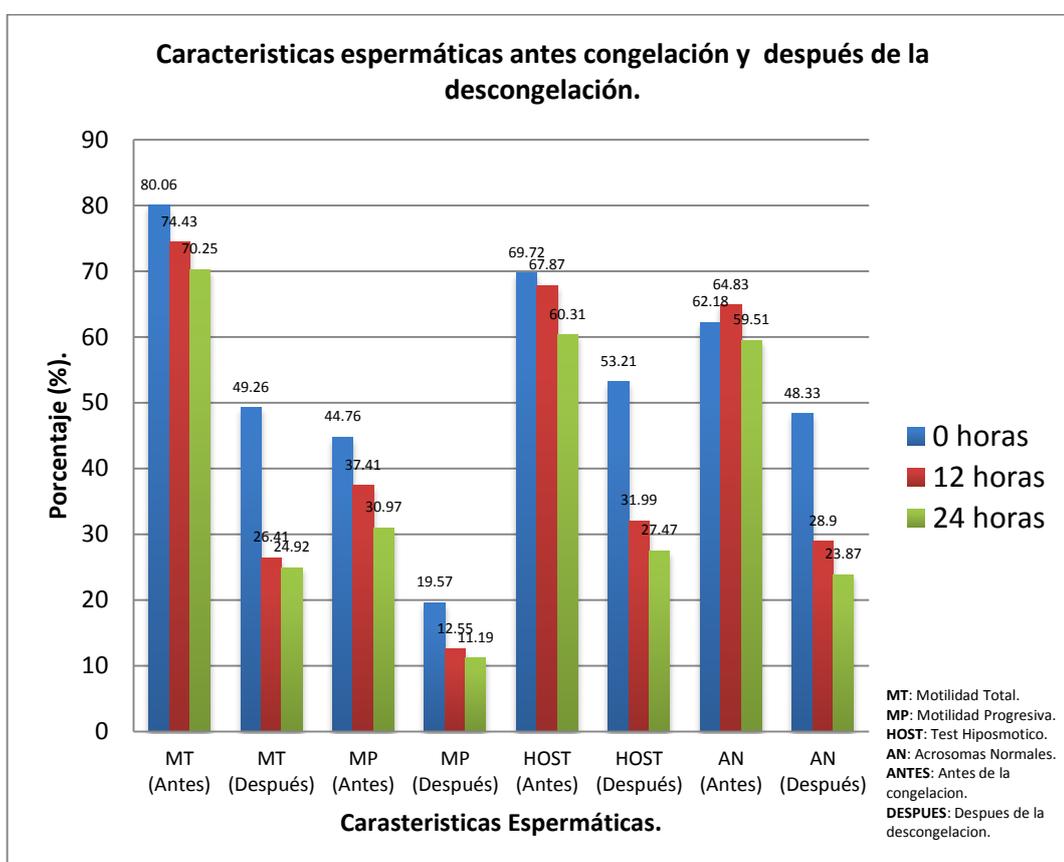
Lo mismo fue reportado en ovinos por Kaabi *et al.* (2003), indican que el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal se mantiene estable después de 24 h de refrigeración de los epidídimos, disminuyendo después de las 48 h de almacenamiento a 5°C. Así mismo, esta característica a la descongelación fue afectada por el proceso de la congelación y por el periodo de tiempo de almacenamiento de los epidídimos a 5°C. Contrariamente en ciervos, Soler *et al.* (2005), no encontraron diferencia significativa a la descongelación después de colectar espermatozoides de la cola de epidídimos almacenados a 5°C por 72 h, esta diferencia podría ser debido a que los espermatozoides del ciervo sean más resistentes al almacenamiento a 5°C y también podría ser debido a la concentración de la yema de huevo, puesto que estos últimos usaron una concentración del 20% y mientras Kaabi *et al.* (2003) de 10%.

En general, se encontró una conservación de la vitalidad, motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad de acrosoma durante la refrigeración de los epidídimos a 5°C después de 24 h, como se puede observar en la Figura 01. Lo cual confirma lo encontrado por Martins *et al.* (2009) en toros; por Kaabi *et al.* (2003) en ovinos y por Soler *et al.* (2005) en ciervos. Esto evidenciaría que el epidídimo posee condiciones adecuadas para prolongar la supervivencia del espermatozoide (Martins *et al.*, 2009). Además, la viabilidad espermática es afectada por la duración y la temperatura a la cual fue sometido el animal muerto o los testículos antes de que los espermatozoides sean colectados de la cola del epidídimo (Soler *et al.*, 2005). Por consiguiente, la refrigeración a 5°C es necesaria para minimizar la pérdida de energía, el compromiso de la integridad espermática y extender la supervivencia espermática así como la capacidad fertilizante por extensos periodos de tiempo (Soler *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009).

En cambio, a la descongelación se encontró que las características espermáticas evaluadas fueron afectadas drásticamente por el proceso de la congelación-descongelación y conforme aumentaba el periodo de refrigeración, aunque a la descongelación en el periodo de refrigeración a 0 h se encontró tasas espermáticas aceptables en el test hiposmótico. Sin embargo, en los espermatozoides de epidídimos refrigerados a 5°C por 12 y 24 h se encontraron menores tasa de recuperación en todas las características evaluadas a la descongelación, esto es debido posiblemente a que los espermatozoides refrigerados sufren más daños por efecto de la congelación y descongelación (Martins *et al.*, 2009). En contraste con los resultados del presente trabajo, sea reportado que una alta proporción de espermatozoides pierden su motilidad u otras funciones después de la descongelación debido al daño durante el proceso de la congelación-descongelación y la recuperación de la motilidad espermática es menor que

50% en la mayoría de los mamíferos. Con respecto a las causas que produce el daño espermático por el proceso de la congelación-descongelación existen varias hipótesis como shock por frío, estrés osmótico, formación de cristales de hielo y por daño oxidativo (Watson, 2000).

FIGURA 01. Características seminales antes de la congelación y después de la descongelación de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de toros criollos *post mortem*.



4.2. PRUEBA DE FERTILIDAD *IN VIVO* DE ESPERMATOZOIDES DE TOROS CRIOLLOS *POST MORTEM*

La prueba de fertilidad *in vivo* se realizó mediante la inseminación artificial de 13 vacas Brown Swiss del CIP. Chuquibambilla, con muestras espermáticas obtenidas del epidídimo de un toro criollo *post mortem* que correspondía al periodo de refrigeración de hora 0 (0 h), con una concentración de 50×10^6 espermatozoides/pajilla. Algunas características físicas del toro fueron; dentadura 4 dientes, de color negro y con una condición corporal de 2.5 (en escala de 1 a 5) (Edmonson *et al.*, 1989). Las características seminales de los espermatozoides obtenidos del epidídimo del toro criollo se muestran en la Tabla 08.

TABLA 08. Característica espermática antes de la congelación y después de la descongelación.

Ítem.	Antes de la Congelación.	Después de la Descongelación.
Concentración ($\times 10^6$)	360	NE
Vitalidad (%)	72.16	NE
Normalidad (%)	66.67	NE
Anormalidad (%)	33.33	NE
Motilidad Total (%)	81.56	28.87
Motilidad Progresiva (%)	42.78	8.05
HOST (%)	66.09	40.17
Integridad Acrosoma (%)	68.32	33.33

NE= No evaluado.

Mediante el diagnóstico ecográfico entre los días 30 – 35 post inseminación, se encontró una fertilidad del 69.2% (9/13). Este resultado muestra uno de los primeros reportes de fertilidad *in vivo* mediante la inseminación artificial de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de un toro muerto y congelados a -196°C , pudiendo

tener esta observación implicaciones muy importantes en la conservación de semen de toros *post mortem*.

Los resultados del presente trabajo son superiores a la publicación de Costa *et al.* (2011), quienes encontraron una tasa de gestación del 20% diagnosticada por ultrasonografía 45 días post inseminación, lo cual condujo al nacimiento de dos crías sanas. Esta diferencia probablemente se debe, a pesar que la dosis de inseminación fue mayor (60×10^6), a que los espermatozoides fueron provenientes de epidídimos refrigerados a 24 y 72 h después de la muerte de los animales, esto según Martins *et al.* (2009) los espermatozoides provenientes de epidídimos refrigerados sufren más daños cuando son congelados, y que probablemente también afecte en la fertilidad de los mismos.

Así mismo, los resultados del presente trabajo son confirmados por los resultados publicados por Barker (1954), quien después de inseminar 11 vacas con espermatozoides del epidídimo congelados a -79°C en ampollas de 1.0 cc de toro Holstein, encontró una tasa de concepción de 63.6% diagnosticada por palpación uterina 52 días post inseminación. Confirmando que los espermatozoides de la cola del epidídimo de toros *post mortem* poseen capacidad fecundante.

Resultados similares fueron publicados con espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo y refrigerados a 5°C a diversos periodos por Amann y Griel (1974) e Igboeli y Foote (1968). Los primeros realizaron una inseminación artificial en vacas Holstein con semen refrigerado a 5°C de toros Holstein entre 12 y 24 h, encontrando una fertilidad de 84% para los espermatozoides de la cola del epidídimo y del 94% para el semen eyaculado. Sin duda, este reporte es superior al resultado obtenido en el presente trabajo debido a que la evaluación de la fertilidad se realizó a los 4 días post

inseminación y además depositaron una concentración de 200×10^6 espermatozoides en cada cuerpo uterino con 43% de motilidad progresiva. En cambio, Igboeli y Foote (1968) realizaron la inseminación de 100 vacas con espermatozoides obtenidas de la cola epidídimo de 3 toros *post mortem* (un toro Holstein y dos toros Angus), los cuales fueron refrigerados a 5°C por 60 h después de la muerte de los animales. Encontraron una tasa de no-retorno de celo en promedio del 69% observado entre 60 - 90 días post inseminación. Esta tasa es similar al resultado obtenido en el presente trabajo con la diferencia que el tiempo de observación es mayor, además las muestras espermáticas fueron provenientes de toros con historial conocido en cuanto a fertilidad.

Por otro lado, resultados similares fueron publicados en otros rumiantes, así como en ovinos por Ehling *et al.* (2006) encontraron una tasa de parición del 87.5% inseminadas con semen de epidídimo congelado-descongelado. Por otro lado, en ciervos por Soler *et al.* (2003), realizaron la inseminación intrauterina de 66 hembras usando muestras espermáticas epididimarios de 3 machos bajo dos protocolos de descongelación (37°C/20 s y 60°C/8 s), encontrando una fertilidad del 69.7% y 42.4% respectivamente, con una fertilidad total del 56.0%. Así mismo, en esta misma especie Garde *et al.* (1998) encontraron 23.5% de crías logradas (4/17). Estos resultados muestran que este método de conservación de semen es eficiente y asociado con altas tasas de fecundidad.

V. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en los periodos de refrigeración a 5°C durante 0, 12 y 24 h antes de la congelación y después de la descongelación fueron en motilidad total: 80.06±11.68, 74.43±10.78, 70.25±14.47% ($p>0.05$) y 49.26±15.68, 26.41±6.82, 24.92±4.89% ($p\leq 0.05$); en motilidad progresiva: 44.76±10.31, 37.41±12.20, 30.97±9.75% ($p>0.05$) y 19.57±5.18, 12.55±4.25, 11.19±2.72% ($p\leq 0.05$); en test hiposmótico: 69.72±7.20, 67.87±4.46, 60.31±7.91% ($p>0.05$) y 53.21±5.53, 31.99±6.87, 27.47±4.86% ($p\leq 0.05$); en integridad de acrosoma: 62.18±7.66, 64.83±3.69, 59.51±7.13% ($p>0.05$) y de 48.33±4.45, 28.90±7.25, 23.87±6.95% ($p\leq 0.05$), respectivamente. El proceso de la congelación-descongelación afectó significativamente en todas las características espermáticas evaluadas ($p\leq 0.05$), encontrándose mejores resultados en el periodo de refrigeración a 0 h.
- Se encontró una fertilidad *in vivo* del 69.2% de espermatozoides congelados-descongelados obtenidos de la cola del epidídimo de toros *post mortem*.

VI. RECOMENDACIONES

- Mantener en refrigeración las muestras de epidídimos para preservar la viabilidad y capacidad de fertilización de los espermatozoides por extensos periodos.
- Congelar los espermatozoides del epidídimo para preservar como un banco de germoplasma de animales de calidad genética o de interés zoológico que pueden morir inesperadamente o de aquellas especies salvajes donde la colección de semen es dificultosa.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Albers, M. y D. Barrios. 2006. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros *post mortem* obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Trop. Vol. 24, No. 3, pp. 267-280.*
- Albers, M. y D. Barrios. 2011. Concentration and Morphology of the Epididymal Spermatozoa from *Post Mortem* Bulls. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 52(2):91-97.*
- Amann, R. y L. Griel. 1974. Fertility of Bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated sperm. *J Dairy Sci 57: 212-219.*
- Amann, R. y B. Schanbacher. 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci., 57: 380-403.*
- An, T., S. Wada, K. Edashige, T. Sakurai y M. Kasai. 1999. Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology 38: 27-34.*
- Awad, M. y J. Graham. 2004. A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the cold surface of cattle fat. *Anim. Reprod. Sc. 84: 83-92.*
- Baracaldo, M., A. Barth y W. Bertrand. 2007. Pasos para el congelamiento de semen bovino: desde la colección del semen hasta el almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido, *Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S. (Ed.), Ithaca NY (www.ivis.org).*
- Barker, C. 1954. Low temperature preservation of bovine epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med 13, 390-393.*
- Barrios, D. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros *Post Mortem*. IX Congreso venezolano de Producción e Industria Animal. Valera.
- Bart, A. y R. Oko. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. Iowa, pag. 285.
- Bertol, M., R. Weiss, V. Thomaz-Soccol, L. Kozicki, A. Fujita, R. Azevedo y K. Green. 2013. Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20°C. *Braz. Arch. Biol. Technol. Vol 56 n.5: 777-783.*
- Brooks, D. 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci. 36: 205-221.*
- Costa, P., C. Martins, V., Franco, L. Rezende, J. Sereno y H. Campos. 2011. Birth of normal calves after artificial insemination using cryopreserved spermatozoa obtained from refrigerated epididymides of death bovin. *Cienc Rural 4(5): 869-874.*
- Curbelo, M. y Z. Rodríguez. 2013. Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. Universidad de la Republica. Facultad de Veterinaria. Tesis de grado para obtener el título de Doctor. Montevideo-Uruguay.

- De Pauw, I. 2003. Bovine semen preservation under epididymal conditions and assement of sperm quality by means of a sperm-oviduct binding assay. Univerteit Gent. Faculteit Diergeneeskunde. Proefschrift ter verkrijging van de grad van Doctor in de Diergeneeskundige Wetenschappen (PhD). Pag. 22-26.
- Edmonson, A., I. Leal, L. Weaver, T. Farver y G. Webster. 1989. A body condition scoring chart of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci* 72:68.
- Ehling, C., C. Struckmann, A. Frenzel, L. Schindler y H. Niemann. 2006. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology* Vol. 66, Issue 9: 2160-2164.
- Evans, G. y W. Maxwell. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. España. Acribia. p. 128-132.
- Fernández-Santos, M., M. Estesos, V. Montoro, A. Soler y J. Garde. 2006. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology* 66: 1931-1942.
- Foote, R. 1970. Influence of extenders, extension rate, and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen. *J. Dairy Sci.* 53:1478–1482.
- Galina, C. 2008. Reproducción de Animales Domésticos. Tercera Edición. Editorial LIMUSA. Mexico.
- Garde, J., N. Ortiz, A. García, A. López y L. Gallego. 1998. Cryopreservation of sperm samples collected *Post mortem* and Artificial Insemination in Iberian Deer. *Arch. Zootec.* 47: 351-356.
- Gutiérrez, R., P. Hernández, R. Fernández y N. Gómez. 2004a. Concentración, motilidad y viabilidad de espermatozoides de tres zonas del epidídimo del toro, *Rev. Salud Anim.* Vol. 26 No. 1: 58-61.
- Gutiérrez, R., P. Hernández, R. Fernández y G. Cruz. 2004b. Congelación de espermatozoides obtenidos de colas de epidídimos de bovinos, *Rev. Salud Anim.* Vol. 26 No. 3: 192-196.
- Hafez, E. y B. Hafez. 2002. Reproducción e inseminación Artificial en Animales. 7ed. Mexico. McGraw Hill Interamericana.
- Harshan, H., L. Singh, A. Arangasamy, M. Ansari y S. Kumar. 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and *in vitro* fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim. Reprod. Sc.* 93: 124-133.
- Hishinuma, M., K. Suzuki y J. Sekine. 2003. Recovery and cryopreservation of Sika Deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymis stored at 4°C. *Theriogenology* 59: 813.
- Holt, W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- Igboeli, G. y R. Foote. 1968. Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, Vol, 57, Issue 2: 212-219.

- Jeyendran, R., H. Van Der Ven, M. Perez-Pelaez, B. Crabo y L. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219-228.
- Jeyendran, R., H. Van der Venn y L. Zaneveled. 1992. The hipo-osmotic swelling test: an update. *Ach. Androl.* 29: 105-116.
- Junqueira, L. y J. Carneiro. 2005. *Histología básica: textos y atlas*. Sexta Edición. Editorial Masson S.A., Barcelona-España.
- Kaabi, M., P. Paz, M. Alvarez, E. Anel, J. Boixo, H. Rouissi, P. Herraez y L. Anel. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60 (2003) 1249-1259.
- Kishikawa, H., H. Tateno y R. Yanagimachi. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *J Reprod Fertil* 116: 217-22.
- Lengwinat, T. y S. Blottner. 1994. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 35: 291-301.
- López, J. 1992. Congelación de semen en la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas. España. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria. p. 7 – 11.
- Martins, C., R. Rumpf, D. Pereira y M. Dode. 2007. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod. Sc.* 101: 326-331.
- Martins, C., K. Driessen, P. Melo Costa, J. Carvalho-Neto, R. de Sousa, R. Rumpf y M. Dode. 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.* 116: 50-57.
- Martinez-Pastor, F. 2004. Obtención post mortem y calidad de los espermatozoides de la cola del epidídimo del ciervo rojo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Universidad de Leon. Facul. Cien. Biol. y Amb. Departamento de Biología Celular y Anatomía.
- Mellisho, E. 2010. *Manual de laboratorio de reproducción Animal*. Universidad Nacional Agrarian la Molina.
- Muiño, R. 2008. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y Citometría de Flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología Animal.
- Noakes, D., T. Parkin-on y G. England. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 8va Edition, ELSEVIER, China: 671-694

- Pujol, A., F. Bayard, J. Louvet y C. Boulard. 1976. Testosterone and dihydrotestosterone concentrations in plasma, epididymal tissues and seminal fluid of adult rats. *Endocrinology*. 98: 111-113.
- Pursel, V., L. Johnson y G. Rampacek. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci*, vol. 34, no. 2: 278-281.
- Randall, D., W. Burggren y K. French. 1997. *Animal physiology*. New York. W.H. Freeman and Company. p. 95.
- Ribeiro-Peres, A., L. Munita-Barbosa, M. Yumi-Kanazawa, M. Mello-Martins y F. Ferreira de Souza. 2014. Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch Med Vet* 46: 31-38.
- Robaire B. y L. Hermo. 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In: Knobil E, O'Neill J (eds). *The physiology of reproduction*. Raven press; New York: 999-1080.
- Rodriguez-Martinez, H. 2000. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. I.V.I.S. Ithaca NY (www.ivis.org).
- Ruiz, G. 2005. Efecto de dos antioxidantes (Tempo y Tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a TRIS. Tesis M. V. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p. 35-45.
- Salamon, S., y W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod.Sci.* 62, 77-111.
- Santiani, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias mención en Biología de la Reproducción. Temuco-Chile. Universidad de la Frontera. p. 27-30.
- SENHAMI. 2005. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología Puno – Perú.
- Shearer, J. 2003. *Reproductive Anatomy and Physiology of Dairy Cattle*, Animal Science Department, Florida cooperative Extension Service, University of Florida.
- Singh, L., H. Harshan y M. Ansari. 2007. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Anim Rep Sci.* 99: 395-400.
- Sisson, S. 2001. *Anatomía de los Animales Domésticos: Sisson y Grossman*, Tomo I, Quinta Edición, 6ta reimpresión, Editorial, Editorial Masson S.A., Barcelona.
- Soler, A., M. Estesó, M. Fernández-Santos y J. Garde. 2005. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymides for several days. *Theriogenology*. 64: 1503-1517.
- Soler, A., A. García, M. Fernández-Santos, M. Estesó y J. Garde. 2003. Effects of Thawing Procedure on Postthawed *In Vitro* Viability and *In Vivo* Fertility of Red Deer Epididymal Spermatozoa Cryopreserved at -196°C. *J Androl.*2003; 24:746-756.

- Sorensen, A. 1982. Reproducción Animal; Principios y prácticas. Editorial Mc Graw-Hill. Mexico.
- Songsasen N., J. Tong y P. Leibo. 1998. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to 24 h after death. *J Exp Zool* 280: 189-96.
- Stachecki, J., K. Ginsburg y D. Armant. 1993. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifyl line and 2'-deoxyadenosine. *J Androl*, 15: 157-164.
- Steinbach J. y R. Foote. 1964. Effects of catalase and anaerobic conditions upon the post-thawing survival of bovine spermatozoa frozen in citrate and Tris-buffered yolk extenders. *J Dairy Sci* 47: 812-815.
- Stevenson, J., J. Higgins y Y. Jung. 2009. Pregnancy outcome after insemination of frozen-thawed bovine semen packaged in two Straw sizes: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 92: 4432-4438.
- Wang, A., H. Zhang, I. Ikemoto, D. Anderson y K. Loughlin. 1997. Reactive oxygen generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49: 921-925.
- Watson, P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post – thawing function. *J. Reprod. Fertil.* 7: 871-891.
- Watson, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Repro. Sci.* 61, 481-492.
- White, W. 1993. The duration of fertility and the histological changes in the reproductive organs after ligation of the vas efferentia in the rat. *Proc R Soc Lond B* 113: 554-60.
- Yu, I. y S. Leibo. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57: 1179-90.

ANEXO

ANEXO 01

Tabla 09. FORMULA DE PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIPOSMÓTICO, Según Jeyendran *et al.* (1984):

Fructosa	1.351 g
Citrato de sodio, 2H ₂ O	7.35 g
Agua destilada	100 mL

Tabla 10. FORMULA DE PREPARACIÓN DEL DILUTOR TRIS-YEMA DE HUEVO Y GLICEROL, Según Harshan *et al.* (2006):

Tris (hidroxi-metil)animo metano	3.028g
Ácido Cítrico, H ₂ O	1.675g
Fructosa	1.25g
Penicilina G	500-1000 UI/mL
Sulfato de Estreptomicina	500-1000 ug/mL
Yema de huevo	10%
Glicerol	7%
Agua Tridestilada	100 mL

ANEXO 02

Tabla 11. NORMALES Y ANORMALES ESPERMÁTICAS (%) EN TRES PERIODOS DE REFRIGERACIÓN A 5°C.

0 HORAS	TORO N°						TOTAL	PROMEDIO	D.S.
Ítem	1	2	3	4	5	6			
ANORMALIDADES	27.835	23.423	30.597	32.381	25.000	30.435	169.671	28.28	3.50
A. PRIMARIAS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00	0.00
A. SECUNDARIAS	27.835	23.423	30.597	32.381	25.000	30.435	169.671	28.28	3.50
gota proximal	1.031	1.802	0.746	0.000	0.000	0.000	3.579	0.60	0.74
cabeza libre	0.000	0.000	0.746	0.000	1.786	1.739	4.271	0.71	0.86
gota distal	17.526	12.613	20.149	17.143	13.393	21.739	102.562	17.09	3.60
flagelo (doblado)	9.278	9.009	8.955	15.238	9.821	6.957	59.259	9.88	2.80
NORMALES	72.165	76.577	69.403	67.619	75.000	69.565	430.329	71.72	3.50
12 Horas	TORO N°						TOTAL	PROMEDIO	D.S.
Ítem	1	2	3	4	5	6			
ANORMALIDADES	28.182	27.928	48.515	24.627	24.510	56.731	210.492	35.08	13.92
A. PRIMARIAS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00	0.00
A. SECUNDARIAS	28.182	27.928	48.515	24.627	24.510	56.731	210.492	35.08	13.92
gota proximal	0.000	0.901	0.990	0.000	0.000	0.000	1.891	0.32	0.49
cabeza libre	5.455	0.000	0.990	0.746	0.980	0.000	8.171	1.36	2.06
gota distal	17.273	18.018	34.653	6.716	9.804	28.846	115.311	19.22	10.78
flagelo (doblado)	5.455	9.009	11.881	17.164	13.725	27.885	85.119	14.19	7.81
NORMALES	71.818	72.072	51.485	75.373	75.490	43.269	389.508	64.92	13.92
24 Horas	TORO N°						TOTAL	PROMEDIO	D.S.
Ítem	1	2	3	4	5	6			
ANORMALIDADES	44.751	33.036	28.571	40.441	24.272	33.010	204.081	34.01	7.52
A. PRIMARIAS	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A. SECUNDARIAS	44.751	33.036	28.571	40.441	24.272	33.010	204.081	34.01	7.52
gota proximal	0.000	1.786	0.000	2.941	0.000	0.000	4.727	0.79	1.27
cabeza libre	0.000	0.893	0.000	0.000	0.971	0.971	2.835	0.47	0.52
gota distal	23.757	22.321	16.484	20.588	9.709	10.680	103.538	17.26	6.00
flagelo (doblado)	20.994	8.036	12.088	16.912	13.592	21.359	92.981	15.50	5.24
NORMALES	55.249	66.964	71.429	59.559	75.728	66.990	395.919	65.99	7.52

ANEXO 03

CUADROS DE ANÁLISIS DE VARIANCIA Y PRUEBA DE TUKEY PARA CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS EVALUADAS ANTES DE LA CONGELACIÓN Y DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA MOTILIDAD TOTAL ANTES DE LA CONGELACIÓN.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	2	291.031747	145.515873	0.94 N.S.
Error	15	2310.586818	154.039121	
Total correcto	17	2601.618565		

PRUEBA DE TUKEY PARA MOTILIDAD TOTAL ANTES DE LA CONGELACIÓN.

Alfa	0.05		
Error de grados de libertad	15		
Error de cuadrado medio	154.0391		
Valor crítico del rango estudentizado	3.67338		
Diferencia significativa mínima	18.613		
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
	Media	N	tratamiento.
A	80.061	6	1
A	74.431	6	2
A	70.247	6	3

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA MOTILIDAD TOTAL DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	2	2233.539671	1116.769835	10.60**
Error	15	1580.969323	105.397955	
Total correcto	17	3814.508994		



PRUEBA DE TUKEY PARA MOTILIDAD TOTAL DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Alfa	0.05		
Error de grados de libertad	15		
Error de cuadrado medio	105.398		
Valor crítico del rango estudentizado	3.67338		
Diferencia significativa mínima	15.396		
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
	Media	N	tratamiento
A	49.259	6	1
B	26.405	6	2
B	24.922	6	3

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA MOTILIDAD PROGRESIVA ANTES DE LA CONGELACIÓN.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	2	570.647754	285.323877	2.45 N.S.
Error	15	1749.786421	116.652428	
Total correcto	17	2320.434176		

PRUEBA DE TUKEY PARA MOTILIDAD PROGRESIVA ANTES DE LA CONGELACIÓN.

Alfa	0.05		
Error de grados de libertad	15		
Error de cuadrado medio	116.6524		
Valor crítico del rango estudentizado	3.67338		
Diferencia significativa mínima	16.197		
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
	Media	N	Tratamiento
A	44.756	6	1
A	37.406	6	2
A	30.974	6	3

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA MOTILIDAD PROGRESIVA DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	2	242.5765638	121.2882819	6.96**
Error	15	261.4820383	17.4321359	
Total correcto	17	504.0586021		

PRUEBA DE TUKEY PARA MOTILIDAD PROGRESIVA DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Alfa	0.05		
Error de grados de libertad	15		
Error de cuadrado medio	17.43214		
Valor crítico del rango estudentizado	3.67338		
Diferencia significativa mínima	6.2613		
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
	Media	N	Tratamiento
A	19.567	6	1
B	12.546	6	2
B	11.191	6	3

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA TEST HIPOSMÓTICO (HOST) ANTES DE LA CONGELACIÓN.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	2	298.1724464	149.0862232	3.33 N.S.
Error	15	671.2688509	44.7512567	
Total correcto	17	969.4412973		



PRUEBA DE TUKEY PARA TEST HIPOSMÓTICO (HOST) ANTES DE LA CONGELACIÓN.

Alfa	0.05		
Error de grados de libertad	15		
Error de cuadrado medio	44.75126		
Valor crítico del rango estudentizado	3.67338		
Diferencia significativa mínima	10.032		
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
	Media	N	Tratamiento.
A	69.724	6	1
A	67.872	6	2
A	60.315	6	3

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA TEST HIPOSMÓTICO (HOST) DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	2	2267.604036	1133.802018	33.59**
Error	15	506.297678	33.753179	
Total correcto	17	2773.901714		

PRUEBA DE TUKEY PARA TEST HIPOSMÓTICO (HOST) DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Alfa	0.05		
Error de grados de libertad	15		
Error de cuadrado medio	33.75318		
Valor crítico del rango estudentizado	3.67338		
Diferencia significativa mínima	8.7126		
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
	Media	N	Tratamiento
A	53.215	6	1
B	31.986	6	2
B	27.470	6	3

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA INTEGRIDAD DE ACROSOMA ANTES DE LA CONGELACIÓN.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	2	84.8740656	42.4370328	1.03 N.S.
Error	15	615.4177541	41.0278503	
Total correcto	17	700.2918197		

PRUEBA DE TUKEY PARA INTEGRIDAD DE ACROSOMA ANTES DE LA CONGELACIÓN.

Alfa	0.05		
Error de grados de libertad	15		
Error de cuadrado medio	41.02785		
Valor crítico del rango estudentizado	3.67338		
Diferencia significativa mínima	9.6057		
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
	Media	N	Tratamiento
A	64.833	6	2
A	62.184	6	1
A	59.515	6	3

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA INTEGRIDAD DE ACROSOMA DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Modelo	2	2001.405469	1000.702734	24.87**
Error	15	603.617177	40.241145	
Total correcto	17	2605.022645		

PRUEBA DE TUKEY PARA INTEGRIDAD DE ACROSOMA DESPUÉS DE LA DESCONGELACIÓN.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	15
Error de cuadrado medio	40.24115
Valor crítico del rango estudentizado	3.67338
Diferencia significativa mínima	9.5132
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.	
Media	N Tratamiento
A	48.329 6 1
B	28.904 6 2
B	23.873 6 3

ANEXO 04

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA VITALIDAD ESPERMÁTICA, PORCENTAJE DE NORMALES Y ANORMALIDADES ANTES DE LA CONGELACIÓN.

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA VITALIDAD ESPERMÁTICA.

TRAT.	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
1	77.88	75.1933333	2.68666667	7.21817778	0.09599492
2	73.29	75.1933333	-1.90333333	3.62267778	0.04817818
3	74.41	75.1933333	-0.78333333	0.61361111	0.00816045
TOTAL	225.58	225.58			0.15233354

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 0.15233354$$

$$\chi^2_{\text{tabular, } \alpha=0.05} = 5.991$$

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA PORCENTAJE DE
ESPERMATOZOIDES NORMALES.

TRAT.	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
1	71.72	67.5433333	4.17666667	17.4445444	0.25827189
2	64.92	67.5433333	-2.62333333	6.88187778	0.10188834
3	65.99	67.5433333	-1.55333333	2.41284444	0.03572291
TOTAL	202.63	202.63			0.39588314

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 0.39588314$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 5.991$$

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA PORCENTAJE DE
ESPERMATOZOIDES ANORMALES.

TRAT.	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
1	28.28	32.4566667	-4.17666667	17.4445444	0.53747184
2	35.08	32.4566667	2.62333333	6.88187778	0.2120328
3	34.01	32.4566667	1.55333333	2.41284444	0.07434049
TOTAL	97.37	97.37			0.82384513

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 0.82384513$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 5.991$$

ANEXO 05

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA DETERMINAR EFECTO DE LA CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN EN MOTILIDAD TOTAL, MOTILIDAD PROGRESIVA, TEST HIPOSMÓTICO E INTEGRIDAD DE ACROSOMA

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA MOTILIDAD TOTAL

A 0 h.

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	80.06	64.66	15.4	237.16	3.6678008
Después de la descongelación	49.26	64.66	-15.4	237.16	3.6678008
TOTAL	129.32	129.32			7.33560161

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 7.33560161$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

A 12 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	74.43	50.42	24.01	576.4801	11.4335601
Después de la descongelación	26.41	50.42	-24.01	576.4801	11.4335601
TOTAL	100.84	100.84			22.8671202

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 22.8671202$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

A 24 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	70.25	47.585	22.665	513.702225	10.7954655
Después de la descongelación	24.92	47.585	-22.665	513.702225	10.7954655
TOTAL	95.17	95.17			21.590931

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 21.590931$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA MOTILIDAD PROGRESIVA.

A 0 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	44.76	32.165	12.595	158.634025	4.93188326
Después de la descongelación	19.57	32.165	-12.595	158.634025	4.93188326
TOTAL	64.33	64.33			9.86376652

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 9.86376652$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

A 12 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	37.41	24.98	12.43	154.5049	6.18514412
Después de la descongelación	12.55	24.98	-12.43	154.5049	6.18514412
TOTAL	49.96	49.96			12.3702882

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 12.3702882$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

A 24 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	30.97	21.08	9.89	97.8121	4.64004269
Después de la descongelación	11.19	21.08	-9.89	97.8121	4.64004269
TOTAL	42.16	42.16			9.28008539

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 9.28008539$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA TEST HIPOSMÓTICO.

A 0 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	69.72	61.465	8.255	68.145025	1.10868014
Después de la descongelación	53.21	61.465	-8.255	68.145025	1.10868014
TOTAL	122.93	122.93			2.21736029

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 2.21736029$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

A 12 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	67.87	49.93	17.94	321.8436	6.44589625
Después de la descongelación	31.99	49.93	-17.94	321.8436	6.44589625
TOTAL	99.86	99.86			12.8917925

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 12.8917925$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

A 24 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	60.31	43.89	16.42	269.6164	6.14300296
Después de la descongelación	27.47	43.89	-16.42	269.6164	6.14300296
TOTAL	87.78	87.78			12.2860059

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 12.2860059$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

ESTADÍSTICO DE JI-CUADRADA (χ^2) PARA INTEGRIDAD DE ACROSOMA.

A 0 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	62.18	55.255	6.925	47.955625	0.86789657
Después de la descongelación	48.33	55.255	-6.925	47.955625	0.86789657
TOTAL	110.51	110.51			1.73579314

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 1.73579314$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

A 12 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	64.83	46.865	17.965	322.741225	6.88661528
Después de la descongelación	28.9	46.865	-17.965	322.741225	6.88661528
TOTAL	93.73	93.73			13.7732306

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 13.7732306$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

A 24 h

ÍTEMS	VALORES OBSERVADOS (O)	VALORES ESPERADOS (E)	O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E
Antes de la congelación	59.51	41.69	17.82	317.5524	7.61699208
Después de la descongelación	23.87	41.69	-17.82	317.5524	7.61699208
TOTAL	83.38	83.38			15.2339842

$$\chi^2_{\text{calculada}} = 15.2339842$$

$$\chi^2_{\text{tabular}, \alpha=0.05} = 3.841$$

ANEXO 06



FOTO 01. Camal Municipal de El Collao-Ilave. Lugar de colección de los epidídimos de toros criollos *Post mortem*.



FOTO 02. Colección del complejo escroto-testículos-epidídimos de toros recién sacrificados.



FOTO 03. Transporte del complejo escroto-testículos-epidídimos en caja de tecnopor.



FOTO 04. Disección y separación de la cola del epidídimo del resto de las estructuras del testículo.



FOTO 05. Corte y colección de espermatozoides de la cola del epidídimo en dilutor Tris – yema de huevo previamente atemperados a 35°C.



FOTO 06. Materiales y Equipos necesarios para la evaluación seminal.



FOTO 07. Congelación de semen en pajillas de 0.25 mL en vapores de nitrógeno a 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido durante 10 minutos.



FOTO 08. Almacenamiento de semen en Nitrógeno líquido hasta su posterior evaluación y/o uso.

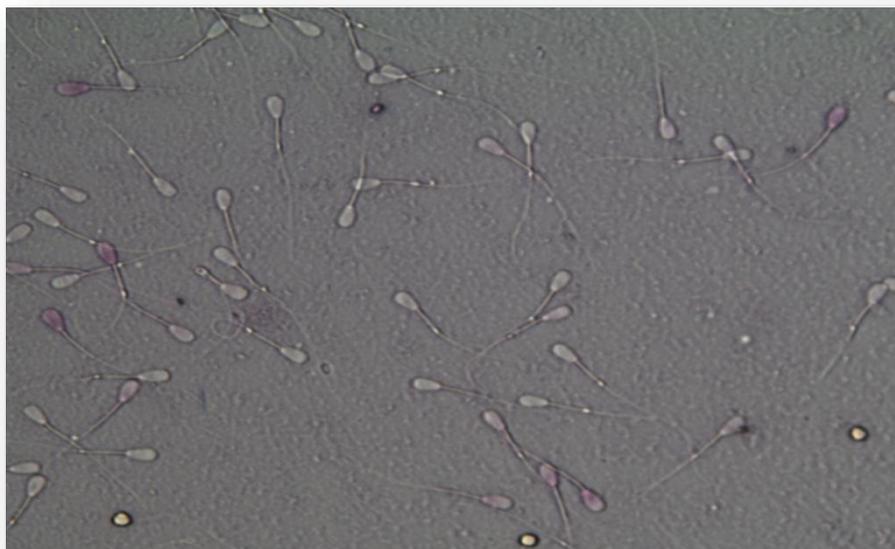


FOTO 09. Tinción Eosina-Negrosina. Aumento 400X



FOTO 10. Test hipo osmótico. Aumento 400X



FOTO 11. Prueba de Fertilidad *in vivo* mediante la inseminación artificial.



FOTO 12. Una Cría nacida.



FOTO 13. Una Cría nacida



FOTO 14. Dos crías nacidas.