

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**



**TESIS**

**CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COLECTADOS DEL  
EPIDÍDIMO DE CARNEROS CRIOLLOS Y VIABILIDAD *In vitro*.**

**PRESENTADA POR:**

**DUANY CONDE MAYTA CUTIPA**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIA ANIMAL**

**MENCIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**PUNO, PERÚ**

**2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

TESIS



CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COLECTADOS DEL  
EPIDÍDIMO DE CARNEROS CRIOLLOS Y VIABILIDAD *In vitro*

PRESENTADA POR:

DUANY CONDE MAYTA CUTIPA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIA ANIMAL  
CON MENCIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

APROBADO POR EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE

  
Dr. MANUEL GUIDO PÉREZ DURAND

PRIMER MIEMBRO

  
M.Sc. BILO WENCESLAO CALSIN CALSIN

SEGUNDO MIEMBRO

  
M.Sc. NUBIA LILIA CATA CORA FLORES

ASESOR DE TESIS

  
Dr. NATALIO LUQUE MAMANI

Puno, 28 de diciembre del 2017.

**ÁREA:** Reproducción animal.

**TEMA:** Criopreservación de espermatozoides colectados del epidídimo de carneros criollos y viabilidad *In vitro*.

**LÍNEA:** Biotecnología reproductiva.

## DEDICATORIA

A mis queridos padres Zacarías y Vilma,  
por su comprensión y valioso apoyo en la  
realización de mis estudios.

A mi hermana Ana Paola, por su  
apoyo moral constante.

A mi querido abuelito Pedro y a la  
memoria de mi abuelita Sebastiana.



## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional del Altiplano, alma mater en mi formación profesional como Médico Veterinario y Zootecnista y en mi formación académica como Magister en Ciencia Animal.
- A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Altiplano, por haberme brindado la oportunidad para mi formación académica magistral.
- Al M.Sc. Uri Harold Pérez Guerra por haberme brindado su acertada dirección en la ejecución de esta tesis magistral.
- Al Dr. Manuel Guido Pérez Durand por haber brindado las facilidades para el uso del Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA – Puno.
- Al Dr. Natalio Luque Mamani por haberme brindado su apoyo incondicional en la culminación del informe final.
- Al Dr. Vladimiro Ibañez Quispe, por su apoyo en el análisis estadístico de los datos del presente informe.
- Al M.Sc. Bilo Wenceslao Calsín Calsín y M.Sc. Nubia Lilia Catacora Flores miembros del equipo de jurado calificador, por las sugerencias en la elaboración del informe final.

**ÍNDICE GENERAL**

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
ABSTRACT	ix

**CAPÍTULO I**

**REVISIÓN DE LITERATURA**

1.1	Marco teórico	4
1.1.1	Anatomía y fisiología del aparato reproductor del macho.	4
1.1.2	Evaluación de la calidad de espermatozoides del epidídimo	10
1.1.3	Factores que afectan la supervivencia de los espermatozoides	14
1.1.4	Fertilización <i>In vitro</i> de Ovocitos	16
1.2	Antecedentes	18
1.2.1	Capacidad Fecundante de Espermatozoides del Epidídimo Antes y Después de Congelación	18
1.2.2	Fertilización <i>In vitro</i> con espermatozoides obtenidos del epidídimo	20

**CAPÍTULO II**

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

2.1	Identificación del problema	27
2.2	Enunciados del problema	29
2.3	Justificación	29
2.4	Objetivos	30
2.4.1	Objetivo general.	30
2.5	Hipótesis	30

2.5.1	Hipótesis general.	30
2.5.2	Hipótesis específicas.	31

### CAPÍTULO III

#### MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Lugar de estudio	32
3.2	Material experimental	32
3.3	Metodología	33
3.3.1	Para las características de viabilidad espermática.	33
3.3.1.1	Colección y transporte de los testículos	33
3.3.1.2	Colección de espermatozoides del epidídimo.	33
3.3.1.3	Evaluación de viabilidad espermática.	34
3.3.1.4	Congelación de espermatozoides del epidídimo	39
3.3.2	Para la fertilización <i>In vitro</i> .	40
3.3.2.1	Obtención de óvulos.	40
3.3.2.2	Preparación de espermatozoides	41
3.3.2.3	La fecundación <i>In vitro</i>	43
3.3.3	Análisis estadístico	44
3.3.4	Diseño estadístico	44

### CAPÍTULO IV

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Capacidad fecundante de espermatozoides colectados del epidídimo.	45
4.1.1	Fertilidad espermática antes de la congelación y después de la descongelación.	45
4.1.2	Fertilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte.	52
4.1.3	Fertilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte según edad del carnero	55
4.2	Fertilización <i>In vitro</i>	57

4.2.1	Óvulos fertilizados	57
4.2.2	Embriones en fase de mórula.	60
	CONCLUSIONES	64
	RECOMENDACIONES	65
	BIBLIOGRAFÍA	66
	ANEXOS	72



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
1. Clasificación para evaluar las estructuras de los ovocitos de bovinos	17
2. Distribución de las Muestras por Tratamiento	32
3. Sistema de valoración de la onda de movimiento.	35
4. Fertilidad espermática de muestras colectadas de la cola del epidídimo de ovinos antes y pos congelación	45
5. Fertilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte.	52
6. Fertilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte, según edad del carnero	55
7. Óvulos fertilizados con espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte, a la descongelación.	57
8. Porcentaje de embriones en la fase de mórula después de 4 días de la fertilización <i>In vitro</i> .	61





## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
1. Análisis de variancia para la motilidad masal antes de la congelación y después de la descongelación	73
2. Prueba de Tukey para la motilidad masal antes de la congelación y después de la descongelación	73
3. Análisis de variancia para motilidad individual antes de la congelación y después de la descongelación	73
4. Prueba de Tukey para la motilidad individual antes de la congelación y después de la descongelación.	74
5. Análisis de variancia para test hipo-osmótico (host) antes de la congelación y después de la descongelación	74
6. Prueba de Tukey para el manejo en el test hipo-osmótico (host) antes de la congelación y después de la descongelación	74
7. Prueba de Tukey para la edad en el test hipo-osmótico (host) antes de la congelación y después de la descongelación	75
8. Prueba de Tukey de técnica para el test hipo-osmótico (host) antes de la congelación y después de la descongelación	75
9. Análisis de variancia para la vitalidad antes de la congelación y después de la descongelación	76
10. Análisis de variancia para la anormalidad de espermatozoides antes de la congelación y después de la descongelación	76
11. Análisis de variancia para la integridad de acrosoma de espermatozoides antes de la congelación y después de la descongelación	76
12. Prueba de Tukey para la edad en la integridad de acrosoma de espermatozoides antes de la congelación y después de la descongelación	77
13. Análisis de variancia para óvulos fertilizados	77
14. Análisis de variancia para embriones en fase de mórula	78
15. Fórmula de preparación del dilutor tris-yema de huevo y glicerol,	78
16. Preparación de soluciones stocks y medios de cultivo de trabajo	78
17. Fert-talp solución de trabajo	79
18. Sperm-talp solución de trabajo	79
19. Preparación de las gotas de maduración (IVM)	80
	vii

20. Preparación de gotas de fecundación (IVF)	81
21. Preparación de gotas de desarrollo (IVC)	82



## RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó con el objetivo de evaluar la capacidad fecundante *In vitro* de los espermatozoides congelados / descongelados provenientes de la cola del epidídimo colectados a través de la técnica de lavado retrogrado y de corte modificado; utilizando un total de 20 testículos de carneros provenientes del Camal Municipal de El Collao-Ilave, inmediatamente después del beneficio; mediante la evaluación de las características espermáticas antes de la congelación y después de la descongelación de los espermatozoides, los ovarios fueron colectados de borregas después de ser beneficiadas, el estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno. Los resultados en la calidad espermática fue: motilidad masal 57,30 % y 50,10%, motilidad individual 54,90 % y 47,90 %, Test Hipo-osmótico 46,60 % y 43,50 % ( $P < 0.05$ ), vitalidad 49,50 % y 47,80 %, anomalías 19,10 % y 18,90 %, integridad de acrosoma 67.70 % y 64.90% ( $P > 0.05$ ) para espermatozoides antes de la congelación y después de la descongelación respectivamente, las técnicas de colección y la edad de los carneros no influyeron en dichos valores. En la fertilización *In vitro* se obtuvo el 89,28 % de óvulos fertilizados con espermatozoides obtenidos por lavado retrógrado y 88,89 % por técnica de corte respectivamente ( $P > 0.05$ ), ésta condición se mantuvo hasta la fase de mórula. Se concluye que los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo congelados/descongelados mantienen su capacidad fecundante.

**Palabras clave:** Criopreservación, epidídimo, espermatozoide, fertilización *In vitro* y ovino criollo.

**ABSTRACT**

This research work was carried out with the objective of evaluating the *in vitro* fertilizing capacity of the frozen / thawed sperm from the tail of the epididymis collected through the retrograde washing and modified cutting technique; using a total of twenty rams testicles from the municipal slaughter house of El Collao-Ilave, immediately after the benefit, mediate the evaluation of the spermatic characteristics before freezing and after thawing the sperm. The ovaries were collected from sheep after being benefitted, the study was carried in the Animal Laboratory of the Faculty of Medicine Veterinary and Zootecnia of the National University of Altiplano-Puno. The results of the spermatic quality were mass motility of 57.30% and 50.10%, individual motility 54.90% and 47.90%, Hypo-osmotic test 46.60% and 43.50% ( $P < 0.05$ ), vitality 49.50% and 47.80%, abnormalities 19.10% and 18.90%, acrosome integrity 67.70% and 64.90% ( $P > 0.05$ ) for spermatozoa before freezing and after thawing, respectively. The collection techniques and the age of the rams did not influence these values. *In vitro* fertilization, 89.28% of ovules fertilized with sperms obtained were obtained by retrograde washing and 88.89% by cutting technique respectively ( $P > 0.05$ ), this condition was maintained until the morula stage. It is concluded that the spermatozoa obtained from the tail of the frozen / thawed epididymis maintain their fertilizing capacity.

**Keywords:** creole sheep, cryopreservation, epididymal, *In vitro* fertilization and spermatozoon,

## INTRODUCCIÓN

En condiciones normales la cola del epidídimo es capaz de acumular un número suficiente de espermatozoides para varias eyaculaciones, lo que torna a este segmento anatómico una fuente de germoplasma, aún poco explorado comercialmente en el carnero (Sostarić *et al.*, 2008); los espermatozoides pueden mantenerse vivos algunas horas después de la muerte del animal, por consiguiente la cola del epidídimo es uno de los principales lugares de almacenamiento de los espermatozoides antes de la eyaculación, permitiendo que éstas células permanezcan viables y móviles por varias semanas (Reyes-Moreno *et al.*, 2002).

La viabilidad de espermatozoides obtenidos del epidídimo de los machos están afectados por los procesos de congelación-descongelación, pero no pierden su capacidad fecundante, tal efecto es evidenciado por (Kaabi *et al.*, 2003), quienes manifiestan que, existen varios estudios sobre la colección de espermatozoides desde la cola del epidídimo, donde se considera que la manipulación en el proceso de congelamiento así como las condiciones de temperatura y el tiempo de la recuperación tienden a reducir la viabilidad de los espermatozoides; así mismo, Aguado *et al.* (1994), al realizar el estudio del tiempo de recuperación de espermatozoides desde la cola del epidídimo a diferentes horas demostraron que a las 24 horas después de muerte tuvieron resultados con mejor viabilidad antes de la congelación y manteniendo esta calidad también después de la descongelación.

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad (Castelo *et al.*, 2008).

La recolección y congelación de los espermatozoides viables del epidídimo de animales muertos (obtención de espermatozoides post-mortem) es una opción importante para preservar gametos masculinos y que permite obtener un banco de germoplasma; además, los espermatozoides recolectados del epidídimo son exitosamente congelables manteniendo su capacidad de fertilización después de la descongelación (Kaabi *et al.*, 2003).

La preservación de un stock genético valioso es necesaria para mantener la variabilidad

genética en los animales domésticos sobre todo en aquellas especies y/o razas que están en peligro de extinción como es el caso de los ovinos de la raza Criollo que en las comunidades de la región Puno está siendo desplazados con la introducción de otras razas de ovinos con mayor rendimiento de carne y lana, pero también con mayores problemas de salud y alimentación para adaptarse a las condiciones naturales del altiplano, donde el ovino Criollo no tuvo problemas habiéndose adaptado a dichas condiciones debido a su rusticidad y prolificidad.

La criopreservación de espermatozoides sigue siendo una opción atractiva para garantizar el mantenimiento de la diversidad genética, aunque las técnicas de recolección y procesamiento de semen están bien establecidos en muchas especies, pero se requiere un personal entrenado para la recolección y garantizar semen de alta calidad. La colección de espermatozoides de la cola del epidídimo de animales beneficiados es una alternativa rápida y barata, el semen obtenido de este órgano proporciona un número suficientemente alto de espermatozoides viables para fertilizar óvulos ya sea *In vitro* o *In vivo* mediante la inseminación artificial como han demostrado varios autores mediante trabajos realizados en otras especies domésticas y silvestres.

En la actualidad, existen estudios realizados sobre la recuperación de los espermatozoides desde la cola del epidídimo de animales posterior a su muerte, los cuales han demostrado que las características de fertilidad de los espermatozoides se mantienen con alta calidad antes y después de la congelación los mismos que lograron fertilizar en óvulos *In vitro* e *In vivo*, dichos trabajos fueron realizados en otras especies animales y en condiciones de clima y temperatura ambientales diferentes a del altiplano.

En vacunos criollos del altiplano (Puno), se realizaron trabajos mediante la recuperación de espermatozoides desde la cola del epidídimo a diferentes horas post mortem y evaluados mediante la inseminación artificial, demostrando que las características espermáticas evaluadas se preservaron antes de la congelación pero fueron afectados por efecto del periodo de refrigeración a la descongelación, los espermatozoides congelados-descongelados tienen habilidad de fertilizar, logrando una fertilidad *In vivo* de 9/13 vacas inseminadas (Quispe, 2015).

Sin embargo, en ovinos, existen pocos estudios sobre la colecta, crio-preservación y uso en técnicas reproductivas asistidas utilizando espermatozoides de la cola del epidídimo,

considerando que en algunas situaciones, ésta puede ser la última oportunidad para la preservación de los gametos de un reproductor, y además, considerando que el ovino Criollo está en peligro de extinción es que, se pretende plantear la conservación de los espermatozoides como un germoplasma que permita utilizar en cualquier momento y de esta forma mantener los animales mejor adaptados al clima del altiplano.

El trabajo de investigación es parte de la línea de investigación en producción de animales domésticos, corresponde al área de la biotecnología de reproducción animal y se realizó con finalidad de recuperar y congelar espermatozoides de la cola del epidídimo de carneros Criollo *Post mortem*, con su consiguiente aplicación en técnicas reproductivas asistidas, para lo que fue necesario la colección de espermatozoides por la técnica de lavado retrógrado y técnica de corte modificado y luego efectuar el estudio de las características de la habilidad fecundante de los espermatozoides mediante la determinación de motilidad individual, motilidad masal, test Hipo-osmótico, vitalidad, anormalidades e integridad del acrosoma para dos momentos antes de la congelación y luego de la descongelación, considerando dos edades de los carneros (2 y 3 años), paralelamente se realizó la colección de ovarios, aspiración de óvulos, maduración y fertilización *In vitro* de los mismos para lograr embriones hasta la fase de mórula.

La investigación presenta resultados del trabajo considerando la viabilidad y fertilidad *In vitro* de los espermatozoides colectados por dos técnicas del epidídimo de carneros criollos, provenientes del camal municipal de la ciudad de Ilave, región Puno, tomando en cuenta la edad de los carneros y el manejo antes de la congelación y después de la congelación para luego realizar la fertilización *In vitro* de los óvulos madurados a nivel de laboratorio; el estudio aborda el siguiente contenido:

- Capítulo I: Revisión de literatura.
- Capítulo II: Planteamiento del problema.
- Capítulo III: Materiales y métodos.
- Capítulo IV: Resultados y discusión.
- Conclusiones, recomendaciones, Bibliografía y Anexos.

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1 Marco teórico

##### 1.1.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del macho.

###### a) Escroto en ovino

Es un saco membranoso que presenta una doble cavidad y está suspendido en la región inguinal del abdomen, forma una estructura larga y pendular, relativamente mayor que la del toro. Cuando no está contraído presenta en la parte dorsal un cuello bien manifiesto. A cada lado del cuello, y ligeramente hacia adelante, pueden observarse de dos a cuatro tetillas rudimentarias. La pared del escroto está formada por tres o cuatro capas, de las cuales la más superficial es la piel. Debajo de ella se presenta una capa fibrosa y muscular, el “dartos”. Las tunicas de cada lado se encuentran en el centro y forman un tabique medio, debajo del dartos existe una fascia escrotal no bien definida, y cubriendo la capa más interna de la pared escrotal se encuentra la túnica vaginal, la túnica vaginal se separa para cubrir los testículos y el cordón espermático, de modo tal que la parte que limita la cavidad se llama “capa parietal” o “túnica vaginal común” y la parte que se divide, “capa visceral” o “túnica vaginal propia”, esta membrana permite el deslizamiento de los testículos en el interior de la bolsa escrotal (May, 1968).

Es un divertículo de la piel que aloja los testículos, epidídimo y parte inicial del conducto deferente, por la parte externa se observa el surco inter-escrotal y el tabique escrotal; en tanto que las capas que conforman son: piel, túnica dartus,



fascia espermática externa, fascia cremastérica externa, fascia espermática interna, capa parietal de la túnica vaginal, cavidad vaginal y la capa visceral de la túnica vaginal, cuyas estructuras tienen la capacidad de retracción y relajación de acuerdo a las condiciones medio-ambientales (Abreu, 2006).

El escroto o saco escrotal es un tejido que cubre y protege a los testículos en aquellas especies donde se encuentran expuestos, como en el carnero constituyéndose en una estructura termorreguladora que mantiene una temperatura 4 a 7° C menor que la corporal. Cuando el animal es expuesto a bajas temperaturas el escroto se recoge, acercando los testículos al cuerpo y viceversa (Rodríguez, 2012).

Las envolturas del testículo se consideran aquellas que las protegen en el escroto y son: la túnica albugínea que recubre al testículo directamente, contiene un líquido que sirve de lubricante y divide al escroto; el cremaster que es el músculo escrotal que se encarga de regular la temperatura de la bolsa escrotal, en el calor se relaja y en el frío se contrae y la piel que es la que recubre al escroto, éstas envolturas cumplen la función de: protección y termorregulación (Alencastre, 1997).

#### **b) Testículos.**

En el carnero, es un órgano de forma ovalada, encerrada en la capa visceral de la túnica vaginal, es relativamente más grande que del toro y mide unos 10 cm de largo, 6 cm en dirección anteroposterior y 5 cm transversalmente. Inmediatamente debajo de la túnica vaginal se halla la túnica albugínea que envuelve fuertemente la glándula y envía tabiques o trabéculas de tejido fibroso que penetran en el tejido glandular. Las trabéculas de la túnica albugínea que penetran en el parénquima forman una estructura para el material glandular y lo dividen en lóbulos. La parte principal del testículo está compuesta por tejido glandular o parénquima, los tubos seminíferos, a partir de los cuales los conductos colectores convergen hacia el mediastino. Los conductos se anastomosan en su curso hacia el mediastino y pasan a lo largo de esta estructura. Cerca del polo dorsal, los conductos eferentes restantes se unen a un conducto único, atraviesa la túnica albugínea hasta unirse con el epidídimo (May, 1968).

Los testículos en el carnero, están situados en la región inguinal y púbica, con una posición vertical, la forma es ovoidea, el tamaño normal es de 7.5 a 11 cm. de largo y 4.7 cm. de ancho con un peso que oscila entre 150 a 180 gramos cada uno (Abreu, 2006).

Las tunicas vaginales parietales y vaginales viscerales envuelven los testículos y las estructuras del cordón espermático. La capa externa es la túnica vaginal parietal y la túnica vaginal visceral, se continúa con el peritoneo parietal de la cavidad abdominal.

Debajo de la túnica vaginal se encuentra la túnica albugínea, una cápsula fibrosa, blanca y densa, están ocupados por tubos seminíferos, entre los que se encuentra células intersticiales que producen la hormona sexual masculina. Los túbulos seminíferos se encuentran en lóbulos en el interior de los testículos y en ellos se producen los espermatozoides, están tapizados por un epitelio seminífero o espermático, Células de Sertoli, que tienen la función de nutrir a los espermios hasta su liberación, también poseen tejido conectivo, encargado de la producción de testosterona (Rodríguez, 2012).

El testículo (Griego: Orchis, Latín: testis y didymus) es un órgano de localización bilateral, que al igual que el ovario, se desarrolla en ambos lados en la región lumbar, medial al riñón embrionario (mesonefro), a partir de la cresta gonadal. Desde ésta situación intra-abdominal el testículo se desplaza hasta las bolsas escrotales (scrotum) situadas en el exterior de la cavidad abdominal. Mediante el desplazamiento de los testículos a las bolsas escrotales, se logra disminuir algunos grados de temperatura del órgano, lo cual es necesario para el correcto desarrollo de las células germinales masculinas (König y Liebich, 2010).

El carnero tiene dos testículos de forma ovoide y de posesión inguinal, en el adulto miden 16 cm. de largo, 6 de ancho, 5 de espesor y pesan en promedio 250 gramos, durante la vida fetal se sitúan en la cavidad abdominal junto a la cara ventral de cada uno de los riñones; conforme desarrollan, van descendiendo hacia el escroto, concluyendo éste a la mitad de la vida fetal, en caso de que no haya descenso, el animal será estéril, por cuanto la temperatura abdominal es mayor que la escrotal en 4 a 5 grados centígrados, lo que elimina la viabilidad de los espermatozoides (Alencastre, 1997).

### c) Epidídimo.

Esta estructura se forma por la confluencia de los túbulos eferentes de los testículos en el extremo dorsal y en la línea media. Poco después de su origen se forman ondulaciones, que se extienden hasta la parte ventral sobre la superficie anterior, desde un tercio hasta la mitad de su longitud. La porción ondulada constituye la cabeza del epidídimo. Cuando alcanza el polo dorsal, forma el cuerpo, que pasa por debajo de la superficie posterior hacia el polo ventral. Allí incurva nuevamente y forma la cola del epidídimo (May, 1968).

En el carnero al igual que en otras especies está formado por tres partes: cabeza, ocupa parte del borde libre y extremidad dorsal del testículo, contiene de 17 a 18 conductos eferentes, cuerpo, es alargado y se encuentra en la superficie media del borde adherente del testículo, está ocupado por la mayor proporción del conducto del epidídimo cuya dimensión abarca de 47 a 52 metros, cola, ubicada en la extremidad ventral del testículo, de forma cónica, incluye la última porción del conducto del epidídimo y el inicio del conducto deferente (Abreu, 2006).

El epidídimo se localiza sobre el margen dorsal del testículo. Está constituido por un tubo único arrollado sobre sí mismo, anatómicamente consta de tres partes: cabeza, cuerpo y cola; ésta última porción se continua con el conducto deferente. En la cabeza desembocan los conductos eferentes y su unión forma la propia cabeza del epidídimo, continúa el conducto formando el cuerpo y la parte final es la cola que se continúa con el conducto deferente. En el epidídimo se transportan, concentran, maduran y almacenan los espermatozoides para en el momento de la eyaculación pasar al conductos deferente y ser expulsados, si no hay eyaculación los espermios, son absorbidos por las células de la cola del epidídimo (Rodríguez, 2012).

El epidídimo presenta tres partes, para su descripción, cabeza, cuerpo y cola; tiene una longitud aproximada de 24 metros, la cabeza está en contacto con el rete testes en la parte superior del testículo, no muy abultada y de consistencia suave; el cuerpo es delgado que corre lateralmente al testículo y la cola, está ubicada en la parte baja, es de consistencia suave y abultada. La función del epidídimo es de pasaje o conducción, maduración, conservación de espermatozoides y también en el aporte de Glicerilfosforilcolina (GPC) al semen

(Alencastre, 1997).

En la cabeza del epidídimo, que está firmemente unida con los testículos ingresan los conductos eferentes del testículo para reunirse en el conducto del epidídimo. El conducto, densamente contorneado, forma en primer lugar el cuerpo del epidídimo que, fijado por medio del mesoepidídimo, está situada en porción caudal o dorsal con respecto al contorno longitudinal medial del testículo. En el conducto del epidídimo terminan de madurar los espermatozoides, que quedan almacenados en su porción terminal, la cola del epidídimo, hasta la eyaculación. Por ese motivo, en el conducto del epidídimo se reabsorbe líquido testicular, se fagocitan fragmentos celulares y se secretan sustancias nutritivas para los espermatozoides. La longitud del conducto del epidídimo del carnero es de 47 a 52 metros (König y Liebich, 2010).

Las funciones del epidídimo son el transporte y la maduración de los espermatozoides (Barrios, 2002). El epidídimo cumple funciones importantes durante la espermatogénesis puesto que en este no solo se liberan los restos del aparato de Golgi y la gota citoplasmática estos adquieren movimientos independientes, sino que también los espermatozoides adquieren la capacidad para lograr óptimas tasas de fertilización (Salisbury *et al.*, 1982 y Hafez, 2000).

#### **d) Conducto deferente.**

En el carnero tiene una longitud de 45 a 50 cm. de largo y un ancho de 2 mm, cuyas relaciones son por la parte inicial que es medial al cuerpo del epidídimo y la extremidad dorsal del testículo donde integran el cordón espermático que tiene una posición caudo- medial, a nivel del anillo vaginal se separa del cordón espermático, al llegar al cuello de la vejiga presenta engrosamiento glandular conocido como ampolla del conducto deferente que tiene un tamaño de 6 a 7 cm y 0.6 cm de ancho (Abreu, 2006).

El conducto deferente aparece en el costado interno dorsal de la cola y pasa dorsalmente por encima de la superficie posterior del testículo, hacia la porción interna del cuerpo del epidídimo (ésta se halla ligeramente interna sobre la superficie posterior del testículo). Se encuentra cubierto por la túnica vaginal, que es un desprendimiento del mesorquio y está acompañado por

pequeños vasos sanguíneos flexuosos (arteria y vena deferentes) (May, 1968).

Es un tubo de naturaleza muscular que va desde la cola del epidídimo hasta la uretra pélvica. Recorre el escroto, sigue en la pelvis, al llegar a la vejiga urinaria se curva y termina encima de la próstata. Junto con los vasos y nervios que se dirigen al testículo constituyen el cordón espermático. La última parte, se dilata y forma la ampolla del conducto deferente. Su función es impulsar a los espermatozoides desde el epidídimo a la uretra en el momento de la eyaculación (Rodríguez, 2012).

Es un conducto que se inicia en la cola del epidídimo, pasa por la parte cercana al tabique del escroto, junta a la cabeza del epidídimo, lugar aparente para hacer las intervenciones de vasectomía en carneros, mide 75 cm. y desemboca en la porción pélvica de la uretra, en la ampolla de Henle. La función que desempeña es de conducción, almacenaje y aporte de fructosa y ácido cítrico (Alencastre, 1997).

Al principio el conducto deferente discurre levemente contorneado en la mitad del testículo se desplaza en línea recta a lo largo de la superficie testicular medial y finalmente transcurre en dirección medial hacia el cordón espermático hasta llegar al anillo vaginal, por allí penetra en la cavidad abdominal, sitio en el que forma un arco convexo en dirección craneal, se une a la pared abdominal, cruza ventralmente al uréter y desemboca en la parte inicial de la uretra, a nivel del colículo seminal (König y Liebich, 2010). Indica como funciones del conducto deferente lo siguiente: pasaje de los espermatozoides, almacenamiento de los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación, y en vacunos también tiene la función de agregar fructuosa y ácido cítrico al semen (Barrios, 2002).

El transporte del esperma a través de los conductos deferentes, es llevado a cabo por las cilias de las células epiteliales y a través del epidídimo es consumado por la contracción localizada de los músculos lisos de la pared epididimal. El tránsito del esperma a través de los conductos eferentes y del epidídimo está asociado con significativos cambios en la maduración del mismo. Esto incluye:

- i. Aumento de la capacidad de la motilidad progresiva.
- ii. Condensación final del núcleo y una fuerte modificación en la forma del acrosoma.

- iii. Alteración de la superficie de la membrana plasmática.
- iv. Migración de la gota citoplasmática de proximal a distal (en la posición en la pieza media).
- v. Reabsorción, fagocitosis y licuefacción de los espermias defectuosos.
- vi. Absorción de los líquidos de los tubos seminíferos y red testicular, aumentando de esa forma la concentración espermática (Allende, 2007).

#### **e) Cordón espermático.**

En el carnero como en otras especies domésticas está formado por las siguientes estructuras anatómicas: arteria testicular, vena testicular, vasos linfáticos, plexo testicular, conducto deferente, músculo cremaster interno y capa visceral de la túnica vaginal (Abreu, 2006).

El cordón espermático es similar a un cordón, cumple función de sostén del escroto y contiene los siguientes elementos: paquete de músculos, arterias, venas, vasos linfáticos, nervios, plexo pampiniforme, conducto deferente y la capa de la túnica albugínea o vaginal, que es la prolongación del peritoneo (Alencastre, 1997).

#### **1.1.2 Evaluación de la calidad de espermatozoides del epidídimo**

##### **a) Concentración espermática**

La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra, 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 de 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).

### **b) 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, conocido como el número de espermatozoide con motilidad de una cantidad total de espermatozoides contados expresados en porcentaje. 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 y Muiño, 2008).

Existen Varias técnicas de estudio de motilidad, pero la más utilizada 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).

### **c) 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, Fucsina 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).

#### **d) Morfología espermática**

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 o una gota de espermatozoides 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)

#### **e) Test hipo-osmótico (Hypo-Osmotic Sperm Swelling Test, HOST)**

Los espermatozoides de mamíferos bajo condiciones hipo-osmóticas se “hinchan” 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).

La prueba de permeabilidad de membrana, vía endosmosis o Hipo Osmótica Swelling Test (HOST), está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática. En la endosmosis positiva se observa como el flagelo del espermatozoide en un medio hipo-osmótico (100 mOsm/ mL) se torciona



helicoidalmente y asciende dentro de la misma membrana celular (Vázquez *et al.*, 1997).

Debido a un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al compartimento intracelular y como consecuencia de la célula aumenta su volumen. Los espermatozoides con membrana funcional muestran un flagelo en curva, mientras que los espermatozoides no viables, mantienen sus colas rectas (Guthrie *et al.*, 2002).

En condiciones fisiológicas normales, la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide está bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta; por lo tanto, la prueba hipo-osmótica es un buen indicador del funcionamiento de la membrana espermática (Watson, 1992); a diferencia de las tinciones vitales, que solo permiten ver la integridad morfológica de la membrana (Brito *et al.*, 2004).

#### **f) 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 estas 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 una solución citrato de formalina o cualquier otro medio con la finalidad de inhibir la motilidad (Awad y Graham, 2004; Pursel *et al.*, 1972).

### 1.1.3 Factores que afectan la supervivencia de los espermatozoides

El semen de buena calidad se deteriora con facilidad, es muy sensible a los cambios ambientales y a otras circunstancias, es aconsejable el tomar medidas precautorias cuando se manejan muestras de semen. Los factores que pueden afectar a la supervivencia de los espermatozoides son los siguientes:

#### a) Temperatura

La temperatura del semen en el momento de la eyaculación, es próxima a la del cuerpo (37.5 °C). La exposición del semen a temperaturas superiores a la indicada aumenta el ritmo metabólico, se agotan las reservas de energía y decrece la vida media del espermatozoide. Temperaturas superiores a los 45°C matan a los espermatozoides. La disminución de la temperatura reduce el metabolismo de los espermatozoides. Con lo que de esa forma se pierde definitivamente la capacidad fertilizante de aquel semen este fenómeno se llama shock de frío. Consecuencia de una exposición accidental al aire frío o al utilizar material de vidrio frío a la hora de recolectar el semen o al visionarlo al microscopio. También se pondrá especial cuidado, cuando se diluya el semen el diluyente debe estar a la misma temperatura que el semen. El enfriamiento lento del semen a 2 – 5 °C no es fatal. La reducción del metabolismo a esta temperatura contribuye a prolongar la viabilidad de los espermatozoides. Al calentar de nuevo la muestra se restaura la motilidad y los espermatozoides permanecen fértiles (Evans y Maxwell, 1990).

#### b) Luz

La luz solar directa es muy perjudicial para el semen, una exposición corta a la luz solar puede reducir la viabilidad de los espermatozoides y si esa exposición se prolonga a 30 – 40 minutos pueden morir. Es aconsejable evitar la exposición directa del semen a la luz solar con lo que las operaciones de recogida y manejo del semen se deben hacer en interiores y lejos de los rayos de luz que puedan penetrar por las ventanas. Así mismo, es conveniente evitar exposiciones del semen a la luz fluorescente intensa o a la radiación ultravioleta (Evans y Maxwell., 1990).

**c) Contacto con metal**

El contacto con metal, de cualquier tipo, es peligroso para los espermatozoides; por esta razón, solo se debe utilizar material de vidrio o equipos de materiales sintéticos inertes cuando se trate de recoger, diluir, conservar e incluso en la práctica de la inseminación (Evans y Maxwell, 1990).

**d) Contacto con agua**

El agua reduce la presión osmótica del plasma seminal con lo que puede matar a los espermatozoides. Por lo tanto, el agua se comporta como un peligroso agente espermicida, por lo que nunca deberá ponerse en contacto el semen con el agua. Antes de usarlo, todo el material deberá secarse con esmero. Se pondrá especial atención cuando se deje el semen en el baño de agua, para que salpique nada de agua al semen (Evans y Maxwell, 1990).

**e) Impurezas y bacterias**

Las bacterias, el polvo y otros contaminantes que pueden estar contenidos en el semen reducirán e incluso matarán, la viabilidad de los espermatozoides. La contaminación del semen ocurre con más frecuencia durante la recogida. Después de recogido el semen se protegerá de los contaminantes del aire cubriendo con una hoja de papel de aluminio o un vidrio de reloj. La proliferación de microbios en el semen se puede controlar por la adición de antibióticos al diluyente (Evans & Maxwell, 1990).

**f) Desinfectantes**

Los desinfectantes y antisépticos son muy peligrosos para los espermatozoides, por lo que se evitará su uso. Para esterilizar el material se puede utilizar alcohol al 70%, en agua. Para el material de vidrio se debe utilizar la esterilización mediante calor seco (Evans & Maxwell, 1990).

**g) Exposición prolongada de aire**

El oxígeno del aire incrementa notablemente la actividad metabólica de los espermatozoides con lo que se acumula ácido láctico en el semen. Ese ácido puede reducir el pH del semen por debajo del óptimo esto es pH 7.0, con lo que

la viabilidad de los espermatozoides se reducirá notablemente. El semen, una vez recogida, deberá usarse, de inmediato, ya sea por la inseminación o la conservación (Evans & Maxwell, 1990).

#### **h) Capacidad tamponante del diluyente**

El medio que se utilice para diluir el semen debe tener suficiente capacidad amortiguadora para mantener el pH óptimo. Las desviaciones del pH, bien sea hacia la alcalinidad (por encima del 7.0) o la acidez (por debajo de 7.0), disminuirán la viabilidad de los espermatozoides. Los diluyentes de semen, son capaces de mantener el medio cercano al pH óptimo de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

#### **i) Presión osmótica del diluyente**

Los componentes (solutos), disueltos en el medio y que rodeen el espermatozoide pueden ejercer cierta presión sobre la membrana celular este fenómeno se conoce como presión osmótica y aumenta según la concentración del soluto en el medio. Los medios en los que la concentración son más bajas son isotónicos. Los medios donde las concentraciones son más bajas de solutos son hipotónicos y los que tienen más solutos son hipertónicos. Tanto el hipo como los hipertónicos son peligrosos para los espermatozoides; solo hay un estrecho margen de tonicidad sobre el que puede variar el diluyente sin que afecten los espermatozoides. En efecto, estos permanecen más móviles en medios isotónicos (Evans y Maxwell, 1990).

#### **1.1.4 Fertilización *In vitro* de Ovocitos**

Finalizando el periodo de incubación *In vitro*, los ovocitos maduros se encuentran aptos para ser fertilizados *In vitro*. Tanto para condición *In vivo* como *In vitro*, previo a la fertilización de los ovocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este progresar a través de las células del cúmulus y penetrar la zona pelúcida (Yanagimachi, 1981).

#### **a) Evaluación morfológica de la fertilización**

En general, se considera fertilizado a aquel ovocito que ha emitido el

segundo corpúsculo polar y se visualizan los pronúcleos masculino y femenino y la cola espermática (Del Campo,1993). Sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de las primeras blastómeras como criterio (Fukui, 1990).

**b) Medios empleados y tiempo de fertilización**

De acuerdo al trabajo de revisión realizado por Brackett y Zuelke (1993), la mayoría de las experiencias llevadas a cabo en fertilización *In vitro*, utilizaron básicamente los medios Tyrode’s Albúmina – Lactato- Piruvato (TALP) y Brackett and Oliphant (BO) para el lavado y capacitación del semen. A su vez, la fertilización de los ovocitos puede realizarse en un periodo de tiempo corto (6 a 8 h) o bien, un tiempo largo (18 a 24 h).

**c) Clasificación y evaluación de los COC**

La mayoría de los laboratorios siguen la clasificación de Leibfried y First (1979), quienes hacen una descripción de los COC y los categorizan de acuerdo a la morfología de las células del cúmulus oophorus y las características del ovoplasma.

Tabla 1  
*Clasificación para evaluar las estructuras de los ovocitos de bovinos*

<b>Estructura</b>	<b>Descripción de la categoría</b>	<b>Puntaje</b>
<b>Envoltura</b>	Completo, cumulus oophorus presente, más de tres capas: compacto.	1
	Parcial, cumulus presente, ya sea rodeando completamente al ovocito o < 3 capas: compacto	2
	Expandido, cumulus presente, el componente celular muestra expansión: cumulus celular aparece amontonado y en diferentes lugares	3
	Desnudo, sin cumulus: ovocito rodeado solo por la zona pelúcida.	
<b>Citoplasma</b>	Granulación homogénea que le da al ovocito una apariencia polvorienta: el ovoplasma llena el espacio rodeado por la zona pelúcida	1
	Granulación en racimos o con distribución heterogénea en el ovoplasma, puede estar localizado en el centro del ovocito dejando clara la periferia o puede estar condensada formando un solo montón de apariencia oscura en el ovoplasma: el ovoplasma llena la zona pelúcida	2
	Citoplasma contraído lejos de la zona pelúcida llenándola irregularmente: ovoplasma degenerado, vacuolizado, fragmentado, o en pedazos zona pelúcida vacía.	3

Fuente: Brackett y Zuelke (1993).

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Capacidad Fecundante de Espermatozoides del Epidídimo Antes y Después de Congelación

Algunos parámetros espermáticos evaluados en espermatozoides del epidídimo fueron afectados durante la congelación y descongelación, así se demostró en el estudio realizado con 50 pares de testículos procedentes de carneros de 4 años en promedio recolectados a 0, 24 y 48 horas después de la muerte del animal y conservados a diferentes temperaturas, determinaron que mejores resultados se obtuvieron con espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo a los 24 horas y transportados a 5 °C de temperatura después de la muerte reportando los siguientes resultados: Motilidad total de 69,1 % y 52,3 %, Motilidad progresiva de 46,5 % y 33,6 %, Acrosoma normal de 78,4 % y 55,4 %, Espermatozoides anormales de 14,6 % y 16,4 %, HOS-test de 83,3 % y 53,7 % antes y después de la congelación respectivamente (Kaabi *et al.*, 2003).

Por otro lado valores inferiores encontró Shakeri *et al.* (2008), al investigar el “efecto del manejo de epidídimo sobre la calidad de espermatozoides recolectados *Post mortem* en carneros”, recuperando los espermatozoides de la cola del epidídimo a los 0, 24 y 48 horas después de la muerte del animal, sugieren que los resultados con alta vitalidad espermática fueron los recolectados a los 24 horas y mantenidos a una temperatura de 5 °C, determinando los siguientes datos: Motilidad total de 58,1 % y 38,7 %, Motilidad progresiva de 21,4 % y 13,2 %, Acrosoma normal de 67,2 % y 38,7 %, Hos-test de 73,0 % y 47,9 %, espermatozoides anormales de 25,0 % y 35,1 % antes y después de la congelación respectivamente.

Está demostrado que la congelación y descongelación de semen tiene efecto negativo sobre los caracteres de viabilidad espermática, esa situación se determinó al estudiar semen de carnero descongelado en la inseminación artificial intrauterino en borregas cruzadas, se encontró antes de la congelación del semen motilidad total fue 79,7 % y la proporción de acrosoma normales fue 93,7 % y después de la descongelación ambos parámetros bajaron en más o menos en 20% evaluándose en 60,5 y 72,8% en promedio respectivamente. La crio

resistencia (Valor después de la descongelación / valor antes de la congelación 1% respectivamente (Ehling *et al.*, 2006).

Los trabajos con espermatozoides del epidídimo se realizaron a diferentes temperaturas y den condiciones distintas, en un estudio sobre temperaturas de crio conservación de pares de testículos uno de ellos conservados a temperatura ambiente Grupo A y la otra empaquetado en hielo Grupo B. Los espermatozoides fueron recuperados de la porción distal del epidídimo por corte e insuflación con 20 mL de un dilutor Kenney, para luego centrifugarlo, las muestras fueron congelados y descongelados, luego evaluados en motilidad progresiva siendo 7.35% para el grupo B el hinchamiento hipo osmótico fue 24,21% y 38 A y de 24,21% para el grupo A y B respectivamente (Neild *et al.*, 2006).

Al evaluar dos métodos de obtención de espermatozoides del epidídimo de venados rojos de Iberia por corte e insuflación de los conductos del epidídimo y del conducto deferente. Reporta que el número de espermatozoides no tiene diferencia significativa en los métodos obteniéndose una media de  $439,7 \times 10^6$  y  $648 \times 10^6$  de espermatozoides para los métodos de corte e insuflación, respectivamente pero si se encontró diferencia respecto a la limpieza de las muestras, por medio de cortes se obtuvieron mucho más contaminados que aquellos obtenidos por insuflación (Marínez *et al.*, 2006)

Considerando que la criopreservación de espermatozoides es importante para la preservación del germoplasma masculino de animales de valor zootécnico que pueden morir inesperadamente, en el estudio se compara dos formas de congelación convencional y automatizado de espermatozoides recolectados de 22 epidídimos de toros utilizando la técnica de flujo retrógrado con medio diluyente sin crioprotector, fueron analizados en cuanto a la motilidad, vigor, integridad estructural y funcional de la membrana plasmática, viabilidad, actividad mitocondrial e integridad del ADN. Las muestras de espermatozoides frescos presentaron resultados superiores en todos los parámetros realizados comparados con los métodos de congelación convencional y automatizada con excepción de los parámetros hipo-osmóticos, donde las muestras de espermatozoides frescos no tuvieron alteraciones significativas. La motilidad media de los espermatozoides frescos fue de 74 % y de 29 y 25 % en los congelados por técnica convencional

automatizada respectivamente. (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014).

Recientemente Quispe (2015), realizó el trabajo de investigación en toros criollos *post mortem* evaluados mediante inseminación artificial obteniendo los siguientes resultados, 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; 74,43; 70,25% ( $p>0.05$ ) y 49,26; 26,41; 24,92% ( $p<0.05$ ); en motilidad progresiva: 44,76; 37,41; 30,97% ( $p>0.05$ ) y 19,57; 12,55; 11,19 % ( $p < 0.05$ ); en test hipo-osmótico: 69,72; 67,87; 60,31% ( $p>0.05$ ) y 53,21; 31,99; 27,47% ( $p<0.05$ ); en integridad de acrosoma: 62,18; 64,83; 59,51% ( $p>0.05$ ) y de 48,33; 28,90; 23,87% ( $p<0.05$ ); vitalidad espermática antes de congelación fue 77,88; 73,29 y 74,41 % para 0, 12 y 24 horas, respectivamente; anomalías de espermatozoide antes de la congelación de 28,28; 35,08 y 34,01 % a las 0, 12 y 24 horas respectivamente.

Al estudiar el efecto de tres medios crio protectores en células espermáticas de diferente calidad, obtenida *Post mortem* del epidídimo, de ciervos obtuvieron 35,0% en un medio citrato-fructuosa; 58,6% en un medio tris-lactosa 49,2% en tryladil para motilidad individual cuando los espermatozoides de alta calidad, en cambio en espermatozoides de baja calidad fueron 16,0 y 38,6% para motilidad espermática en medio citrato fructuosa, tris-lactosa y tryladil respectivamente; en lo referente a acrosomas intactos fueron 37,3% y 45,3% para citrato de fructuosa, tris lactosa y tryladil respectivamente en espermatozoides de alta calidad; en espermatozoides de baja calidad encontraron 44,9% y 60,2% para citrato-fructuosa, tris lactosa y tryladil respectivamente (Garde *et al.*, 1992).

### 1.2.2 Fertilización *In vitro* con espermatozoides obtenidos del epidídimo

Kaabi *et al.* (2003) realizando el estudio de la capacidad fecundante de los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo de carneros adultos a los 24 horas después de la muerte y con un grupo control con semen de eyaculación normal en 25 borregas de cada grupo determinaron los siguientes resultados: 58 % de fertilidad *In vitro* con espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo a las 24 horas después de la muerte y 50% de fertilidad *In vitro* con semen de eyaculación normal.



Shakeri *et al.* (2008), realizaron estudios de fertilización *In vitro* con espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo a los 24 horas después de la muerte del animal, determinaron que no existe diferencia estadística significativa entre los resultados de fertilización *In vitro* con semen fresco de eyaculación y espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo después de 24 horas de la muerte del animal ( 50% y 58% de fertilidad *In vitro* con semen fresco y espermatozoides de la cola del epidídimo respectivamente), concluyendo que, espermatozoides colectados de la cola del epidídimo congelados y descongelados almacenados a 5 °C por 24 horas mostró una habilidad de fertilización similar a los espermatozoides congelados y descongelados de una eyaculación.

Al estudiar semen de carnero descongelado en la inseminación artificial intrauterino en borregas cruzadas, el resultado de la inseminación artificial con semen congelado / descongelado proveniente de la cola del epidídimo dio una tasa a la parición de 87.5%, la longitud de la gestión fue 145,6 días, los factores que afectaron potencialmente la cantidad y calidad del espermatozoide del epidídimo son la edad del animal y la estación del año, éste último factor ejerce un efecto benéfico para la calidad del semen (Ehling *et al.*, 2006).

Byrd *et al.* (1996) trabajó con ovocitos ovinos en una incubadora portátil de plástico, en placas de cultivo de tejidos a una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de maduración consistió de bicarbonato tamponada Tissue Culture Medium 199 (TCM) suplementado con suero de ternera fetal (FCS), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), y penicilina / estreptomycin la tasa de fertilización fue de 58,62 %, la tasa de desarrollo de mórula fue de 16,94 % y la tasa de desarrollo de blastocisto fue de 3,06 %. Fournier-Delpech *et al.* (1979), utilizando espermatozoides de eyaculación y diluidos con leche descremada a 15 °C y espermatozoides recolectados de tres porciones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola). La inseminación artificial en borregas se realizó a 57 a 66 horas después de la aplicación de PMSG y la fertilidad se evaluó a partir de 18 días después de la inseminación mediante las concentraciones de progesterona sanguínea, determinando que, las borregas inseminadas con espermatozoides de la cola del epidídimo tuvieron una proporción de 16/20 gestantes (80%) y los espermatozoides de la eyaculación

lograron preñar en 21/29 borregas (72%).

Fournier-Delpech *et al.* (2001), manifiestan que la habilidad de fertilización de los espermatozoides recolectados del epidídimo es bastante conocido. Reportando resultados de inseminación en borregas con espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo congelas y descongeladas lograron una tasa de gestación de 78 – 80%. Fuji *et al.* (2008) investigaron los efectos de una incubadora portátil con una cámara de CO<sub>2</sub> en la viabilidad y desarrollo de ovocitos porcinos, sus resultados indicaron que una incubadora portátil con una cámara de CO<sub>2</sub> puede mantener la viabilidad y el desarrollo de los ovocitos y embriones donde un  $6,7 \pm 2,8\%$  desarrolló la fase de blastocisto.

El espermatozoide colectado del epidídimo del verraco y almacenado por un día a 4 °C y luego congelado, tienen la habilidad para producir crías, así y tres de seis hembras inseminadas resultaran preñadas y una de ellas parió 2 crías normales así mismo oocitos madurados *In vitro*, fertilizados *in vitro* por los mismos espermatozoides fueron transferidos y parió 5 crías normales (Martínez *et al.*, 2006).

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  $50 \times 10^6$  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 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.

También Costa *et al.* (2011), publicaron nacimientos de becerros después de 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 0,25 mL con una concentración de  $15 \times 10^6$  espermatozoides, equilibradas a 5 °C por 4 horas y congelados a 6 cm sobre el nivel del 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 re suspendidos con Tris-yema de huevo obteniendo una dosis de inseminación de  $60 \times 10^6$  de espermatozoides totales, con aproximadamente  $29 \times 10^6$  y  $12 \times 10^6$  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 utilizando espermatozoides del epidídimo recuperados tres días después de la muerte del reproductor.

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 contra lateral vaso deferente mediante canulación. Los espermatozoides fueron diluidos en leche descremada a una concentración de  $200 \times 10^6$  / mL. Luego 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  $200 \times 10^6$  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.

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  $100 \times 10^6$  de espermatozoides 54 h después de 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*.

Con el objetivo de evaluar la influencia del método de colección y la tensión de oxígeno sobre los parámetros de la producción *In vitro* (PIV) de embriones. En el Experimento 1 se comparó el efecto de dos métodos de colección, aspiración y disección sobre la tasa de división y desarrollo embrionario. La tasa de división a las 72 horas pos-inseminación fue de 71.4 y 61.0% con el método de aspiración y de disección, respectivamente ( $p < 0.05$ ), y sin diferencias significativas en la tasa de blastocistos al día 7 y 9 pos- fecundación. En el Experimento 2 se compararon dos tensiones de oxígeno en la etapa de cultivo, 5 y 20% de oxígeno, obteniéndose una tasa de división de 69,7 y 59,7% para el cultivo con 5 y 20 % de  $O_2$ , respectivamente ( $p < 0.05$ ) y un 29,8 y 19,3% de blastocistos al día 7 pos- fecundación bajo 5 y 20% de  $O_2$ , respectivamente ( $p < 0.05$ ), pero sin diferencia estadística en la tasa de blastocistos al día 9 pos-fecundación. Los resultados sugieren que el método de aspiración y el cultivo con una tensión de oxígeno del 5% pueden ser considerados como factores adecuados para lograr las condiciones óptimas en el proceso de producción *In vitro* de embriones bovinos (Benavides *et al.* 2015).

Un medio sintético de oviducto modificado (SOFM) y suplementado con 20 % de suero humano (SH) inactivado fueron utilizados para Cultivo *In Vitro* (CIV), con este medio las investigaciones reportan valores promedios de 85 %, 55 % y 25 % de tasa de Maduración *In Vitro* (MIV), Fertilización *In Vitro* y Cultivo *In Vitro* (CIV) respectivamente de oocitos de ovejas y que finalmente lograron desarrollarse hasta la fase de blastocisto. Más recientemente una alta tasa de 81 % de embriones de una célula lograron desarrollarse hasta la fase de blastocisto bajo

condiciones de laboratorio mediante fertilización *In vitro* empleando el medio SOF-SH (González, 1993).

Se evaluó la tasa de maduración (MIV), de fertilización (FIV) y el desarrollo embrionario (DIV) *In vitro* a partir de ovocitos de oveja madurados en dos medios de cultivo. 57 de los cuales fueron colocados en medio de cultivo para embriones de hámster 9 (HECM-9, y 63 en el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199, ambos medios suplementados con hormona folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y factor de crecimiento epidérmico (EGF); los COC fueron colocados en 450  $\mu$ L de medio de maduración e incubaron por 24 h. Para la FIV, cada grupo de COC fueron transferidos a 450  $\mu$ L de medio de fertilización (SOFm + Oaa) donde se adicionaron  $0,5 \times 10^6$  espermatozoides móviles y fueron incubados durante 24 h; semen fresco obtenido mediante vagina artificial, fue utilizado. La tasa final de producción embrionaria se determinó al día 8 post FIV. La tasa de MIV no mostró diferencias significativas entre los dos tratamientos (73,3 vs 71,4 % en HECM-9 y TCM-199, respectivamente). La tasa de FIV fue diferente entre tratamientos, observando una mejor respuesta de los oocitos madurados en HCEM-9 (47.7 %) respecto a los madurados en TCM-199 (28,6 %) (Robledo *et al.*, 2009).

En un estudio sobre el efecto de dos medios de cultivo en la tasa de maduración y fertilización de ovocitos de cabra. Donde los complejos cumulus ovocito (CCO's) fueron obtenidos de ovarios de cabras *Post mortem*. En el experimento I en TCM-199 (n=171) y HECM-9 (n=190). Ambos medios fueron suplementados con LH y FSH (10 $\mu$ g/mL) y 50 $\mu$ g/mL de gentamicina. Los CCO's fueron cultivados a 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> y a las 27 h post-maduración, fueron lavados en PBS y teñidos con Hoescht 33342 para evaluar la tasa de maduración. En el experimento II (EXP II) en TCM-199 (n=323) y HECM-9 (n=344), En el EXP I, la tasa de maduración nuclear fue superior en HECM- 9 (60,5 %) respecto al TCM-199 (38,6 %), en el experimento II la tasa de maduración *In vitro* (MIV) y de Fertilización *In vitro* (FIV) fue superior en el medio HECM-9 (84,8 % y 19,18 % respectivamente) que en TCM-199 (62,7 % y 9,59 %, respectivamente) (Martínez *et al.*, 2011).

En un estudio realizado en la región de Huancavelica a 3680 m.s.n.m. se utilizaron 672 ovocitos de categoría 1 y 11 obtenidos por aspiración folicular de ovarios de

llamas, fueron madurados en medio TCM-199 suplementado con HEPES 25mM, piruvato de sodio 0.2 mM, sulfato de gentamicina 50 Ug/ml, FSH 0.02 unidades/mL, Estradiol17- B 1 Ug/mL y suero fetal bovino al 10%, e incubados a 38,5°C. Luego, se realizó la fecundación *In vitro* y se evaluó el desarrollo embrionario, Se recuperaron espermatozoides epididimarios en medio Sperm-TALP para luego ser lavados y seleccionados mediante la técnica de Swim-up, Transcurridas las 18 h de fecundación, los presuntos cigotos fueron transferidos al medio SOF-IVC e incubados por 7 días a 38.5°C. Los resultados del desarrollo embrionario, se obtuvo los porcentajes de segmentación, mórula y blastocisto (51,00%; 71,47% y 11,64%) respectivamente para 36 horas y el porcentaje de segmentación, mórula y blastocisto (49,55%; 76,69% y 12,51%) respectivamente para 42 horas, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos (Ayuque y Justiniano, 2013).

Se realizó la prueba de fertilidad mediante la inseminación artificial de 13 vacas Brown Swiss del CIP. Chuquibambilla-Puno, con muestras espermáticas obtenidas del epidídimo de un toro criollo inmediatamente después de la muerte con una concentración de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/pajilla, logrando una fertilidad de 69,2 % (9/13) diagnosticadas por ecografía entre los días 30-35 después de la inseminación (Quispe, 2015).

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 2.1 Identificación del problema

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 y Martins *et al.*, 2009).

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 (Kishikawa *et al.*, 1999., Yu y Leibo., 2002).

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. 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 y 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 espermatozoide 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).

La motilidad de los espermatozoides de la cabeza del epidídimo es nula en tanto que en el cuerpo es mínima y en la cola se acentúa hasta un promedio de 60%, esto tal vez sea debido a que en ciertas porciones del epidídimo se libera un sulfuro a partir de la cisterna, este sulfuro estimula que los espermatozoides al consumo de oxígeno y en combinación con los iones potasio que se encuentran elevados en el epidídimo, se inicia el metabolismo en los espermatozoides con un consecuente consumo de energía y movimiento de los mismos (Salisbury *et al.*, 1982).

Fisiológicamente, a nivel del testículo se realiza la espermatogénesis, específicamente en la cabeza del epidídimo ocurre la reabsorción de solutos y fluidos, en el cuerpo del epidídimo la maduración espermática, y en la cola del epidídimo el almacenamiento de los espermatozoides fértiles (Amann y Schanbacher, 1983).

Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo que tengan motilidad y capacidad de fertilizar, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser congelados para su posterior uso en inseminación artificial (Barrios, 2002).

Cuando un macho muere inesperadamente, su material genético se pierde. Una forma de preservar el germoplasma de estos animales es la colecta de espermatozoides del epidídimo (Martins *et al.*, 2007). Este procedimiento *Post mortem* es considerado una importante herramienta en la utilización de espermatozoides de animales en peligro de extinción (Lambrechts *et al.*, 1999); por lo que se considera que la criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo *et al.*, 2008).

La cola del epidídimo es uno de los principales lugares de almacenamiento de los



espermatozoides antes de la eyaculación, permitiendo que éstas células permanezcan viables y móviles por varias semanas (Reyes-Moreno *et al.*, 2002). La cola del epidídimo es capaz de acumular un número suficiente de espermatozoides para varias eyaculaciones, lo que torna a este lugar una fuente de germoplasma, aun poco explorada comercialmente en el carnero (Sostaric *et al.*, 2008).

## 2.2 Enunciados del problema

Todos los estudios sobre el manejo de espermatozoides de animales silvestres y domésticos fueron realizados en ambientes donde las condiciones y factores del clima son diferentes a las condiciones del altiplano lugar donde se pretende realizar el trabajo, por lo que se plantea las siguientes interrogantes:

- ¿Cómo serán las características de los espermatozoides congelados/descongelados colectados a través de la técnica de lavado retrógrado y corte modificado?
- ¿Cómo es el comportamiento de la fertilización *In vitro* de los espermatozoides colectados desde el epidídimo de carneros criollos en el altiplano?

## 2.3 Justificación

Diferentes estudios han demostrado que es posible obtener espermatozoides viables pasada varias horas después de la muerte del animal a partir de la cola del epidídimo y con alta capacidad fecundante después de la congelación; así mismo también existen trabajos sobre la fertilización *In vitro* y/o *In vivo* con espermatozoides obtenidos del epidídimo, estos trabajos se efectuaron con otras especies animales y en lugares distintos por lo que es necesario realizar dichos estudios a nivel del altiplano.

El presente trabajo de investigación, tiene el propósito de conocer la viabilidad y fertilidad *in vitro* de los espermatozoides colectados del epidídimo a través del método de lavado retrógrado y corte del epidídimo de los testículos de carneros post-mortem y luego realizar la prueba fertilidad con ovocitos madurados *In vitro*, es relevante ya que los resultados constituirán información básica para la apertura de futuras investigaciones relacionadas al tema, y serán un aporte teórico para los profesionales del área de biotecnología de reproducción para que puedan considerar ésta técnica en el mejoramiento genético de los ovinos en el altiplano y sobretodo la recuperación del

germoplasma de ovinos criollos de color que está en extinción.

La importancia radica también en que es una de las primeras investigaciones sobre colecta, crío preservación y uso en técnicas reproductivas asistidas utilizando espermatozoides de la cola del epidídimo, teniendo en cuenta que en algunas situaciones puede ser la última oportunidad para la preservación de los gametos de un carnero, puesto que en la actualidad no existen estudios similares en la región Puno que constituyan como antecedente de estudio, por este vacío de información se ejecutó el estudio.

Así mismo en su valor práctico, los resultados del presente estudio servirán de base para la elaboración de un protocolo del manejo de los espermatozoides recolectados del testículo de animales muertos, que en la actualidad no se tiene ningún tipo de tratamiento reproductivo sobre todo en los ovinos criollos.

## 2.4 Objetivos

### 2.4.1 Objetivo general.

Comparar el efecto de dos métodos de colección de espermatozoides obtenidos del epidídimo de carneros criollos, sobre la viabilidad espermática y Fertilización *In vitro*.

### 2.4.2. Objetivos específicos.

- Evaluar la capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides congelados / descongelados provenientes del epidídimo colectados a través de la técnica de lavado retrogrado y corte modificado.
- Comparar el porcentaje de fertilización *In vitro* de los espermatozoides colectados por lavado retrogrado y corte del epidídimo.

## 2.5 Hipótesis

### 2.5.1 Hipótesis general.

La capacidad fecundante de los espermatozoides provenientes del epidídimo colectados por lavado retrogrado y corte después de la descongelación, muestran índices de fecundación similares.

### 2.5.2 Hipótesis específicas.

- Los espermatozoides colectados mediante la técnica de Lavado Retrogrado y corte modificado tienen una capacidad fecundante *In vitro* superior al 30%.
- La fertilización *In vitro* de los espermatozoides colectados por lavado retrogrado del epidídimo son similares con los obtenidos por corte modificado.



### CAPÍTULO III

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.1 Lugar de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el camal municipal de la ciudad de Ilave y en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno a 3820 m.s.n.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

Para el estudio de la viabilidad espermática se utilizaron 10 testículos de carneros criollos de 2 años edad y 10 testículos de carneros criollos de 3 años de edad, las muestras fueron obtenidas del Camal municipal de El Collao-Ilave de carneros inmediatamente después del beneficio y luego transportados al laboratorio de Reproducción en la ciudad universitaria, donde los epidídimos de los testículos fueron sometidos a los tratamientos de colección, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 2  
*Distribución de las Muestras por Tratamiento*

Animales	N° Testículos	Técnicas de Colección	
		Lavado retrogrado	Corte
n=10			
2 años	10	05 muestras	05 muestras
3 años	10	05 muestras	05 muestras
Total	20	10	10

Para realizar el estudio de la fertilización *In vitro* se colectaron ovarios de las borregas beneficiadas en el Camal municipal de El Collao-Ilave en una cantidad de 8 a 10 ovarios en cada muestreo, los cuales fueron mantenidos a una temperatura de 36 a 37 °C hasta su traslado al laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, para la fertilización se consideraron a aquellos óvulos que fueron viables con un tamaño visible al estereoscopio de aproximadamente de 3 – 7 mm de diámetro, con citoplasma homogéneo y con completo cúmulus oophorus y con capa de revestimiento compacto caracterizados según la clasificación propuesta por Leibfried y First (1979), los cuales se repartieron en cantidades equivalentes para cada bloque en estudio dos técnicas de colección (lavado retrógrado y corte modificado) y dos edades de carneros (2 años y 3 años).

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Para las características de viabilidad espermática.

##### 3.3.1.1 Colección y transporte de los testículos

La colección de los testículos y epidídimos se obtuvieron inmediatamente después del sacrificio de los ovinos, luego del examen de inspección y palpación se seleccionaron los órganos que mostraron características aparentemente normales (tamaño y consistencia).

Una vez seleccionado los testículos junto al epidídimo, se identificaron con D al testículo derecho y con I al testículo izquierdo, luego fueron envueltos en gasa humedecida en PBS y colocados dentro de una caja de tecno por para su transporte hasta el Laboratorio de Reproducción Animal en un tiempo de una hora.

##### 3.3.1.2 Colección de espermatozoides del epidídimo.

La colección de los espermatozoides se realizó al azar; donde un testículo se sometió a la técnica de colección por la técnica de lavado retrógrado (testículo derecho T1) y el otro para la colección por la técnica de corte modificado (testículo izquierdo T2).

**A. Colección por la técnica de lavado retrógrado.**

- ✓ El testículo fue limpiado y secado con una gasa estéril.
- ✓ La cola del epidídimo se diseccionó separando del cuerpo del epidídimo y del conducto deferente.
- ✓ Con una aguja N° 20 G se facilitó la introducción en la luz del conducto deferente; el avocag conectado a una jeringa de tuberculina que contuvo 1 mL de dilutor TRIS.
- ✓ Por presión del embolo de la jeringa se rellenó con el dilutor en todo el conducto del epidídimo.
- ✓ Una vez que el epidídimo estuvo repleto de dilutor TRIS se realizó un corte en la parte del inicio de la cola del epidídimo donde el fluido emergió por el flushing retrogrado y se recibió en un tubo de ensayo de 5 mL.

**B. Colección por la técnica de corte modificado.**

- ✓ El testículo fue limpiado y secado con una gasa estéril;
- ✓ La cola del epidídimo se diseccionó separando del cuerpo del epidídimo y del conducto deferente
- ✓ Luego se realizó un corte transversal en el epidídimo, para recuperar la masa de los espermatozoides en un tubo de ensayo de 5 ml. recipiente que contuvo un 1ml del dilutor TRIS.
- ✓ Esta técnica fue modificada en el Laboratorio de Reproducción Animal de la UNA-Puno.

**3.3.1.3 Evaluación de viabilidad espermática.**

La evaluación de las muestras de espermatozoides recolectados por los dos métodos se realizó al momento de la colección a temperatura de ambiente (5 °C) y luego a la post descongelación tomando en cuenta los siguientes aspectos:

**a) Motilidad Masal.**

La evaluación de la motilidad masal se realizó en un microscopio estereoscópico invertido acoplado con una platina a 37 °C a un aumento de 200 a 400X, procediendo de la siguiente manera:

- ✓ Previamente se dejó calentar láminas porta-objetos y cubre-objetos sobre la platina a 37 °C.
- ✓ Con la ayuda de una jeringa de tuberculina acoplado a un tip de 5 uL. Se aspiró la muestra espermática diluida del tubo de ensayo.
- ✓ La muestra se preparó colocando una gota de semen en una lámina porta-objeto a una temperatura de 37 °C.
- ✓ A continuación se cubrió con una laminilla cubre-objetos de 22 x 22 mm.
- ✓ El vigor de las ondas y su actividad se cuantificó en grados en una escala que va de 0 a 5, que se detalla a continuación:

Tabla 3

*Sistema de valoración de la onda de movimiento.*

Grado	Clave	Descripción
5	Muy bueno	Densa en movimiento de ondas muy rápidas y con jaspes gruesos oscuros. El 90 % o más de los espermatozoides son activos.
4	Bueno	Movimiento en onda vigoroso con jaspe delgado y los remolinos no muy rápidos como para grado 5, alrededor de 70-85% de espermatozoides son activos.
3	Regular	Movimiento de ondas lento, se puede apreciar presencia de movimientos individuales de 45-65% de células espermáticas activas.
2	Pobre	Son movimientos en ondas, se puede apreciar movimientos individuales de 20-40% de los espermatozoides vivos y su motilidad es pobre.
1	Muy pobre	Muy pocos espermatozoides (alrededor del 10%) muestran algún signo de vida, se aprecia movimiento estacionario.
0	Muertos	Todos los espermatozoides no se mueven

Fuente: Evans y Maxwell (1990).

**b) Motilidad Individual.**

La evaluación de la motilidad individual se realizó con una pequeña gota de semen en una lámina porta-objetos cubierto con una lámina cubre-objetos a 37°C y se observó con el objetivo de mayor aumento (400x) para observar los espermatozoides de manera individual, el movimiento fue lineal, progresivo y se calculó en porcentaje (Evans y Maxwell, 1987).

$$\% = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides con movimiento rectilíneo}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de espermatozoides observados}}$$

**c) Evaluación del Test Hipo-osmótico (Host)**

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

- ✓ En un tubo de ensayo se colocó 1 mL. de solución Hipo osmótico en baño María a 37 °C.
- ✓ Una vez temperada la solución Hipo-osmótica 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 porta-objetos y se cubrió con una lámina cubre-objetos, dejándose reposar por 1 minuto 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:



$$\% = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides con cola enrollada e hinchada}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides observados}} \times 100$$

#### d) Evaluación de vitalidad.

Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se utilizó la técnica de coloración de Eosina 5% - Nigrosina 10%, usando un microscopio de contraste de fases a un aumento de 1000X con el siguiente procedimiento:

- ✓ Se colocó las láminas porta-objetos 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 porta-objetos, en seguida se puso una gota de Nigrosina al 10%.
- ✓ Inmediatamente se colocó una gota de muestra espermática 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 lámina porta-objetos de un extremo al otro, utilizando el borde de otro porta-objetos.
- ✓ Inmediatamente se realizó el secado del frotis sobre la platina a 37 °C.
- ✓ Se consideró espermatozoides vivos a aquellos que no presentaron coloración y espermatozoides muertos a los que se tiñeron de color rosado.
- ✓ Los resultados se expresaron en porcentaje, según la siguiente fórmula:

$$\% V = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de espermatozoides vivos}}{\text{N}^{\circ} \text{ Total de espermatozoides}} \times 100$$

### e) Anormalidades

Para su determinación se utilizó los frotices hechos para el porcentaje de vitalidad, considerando a los espermatozoides que se colorearon de color rosado con los colorantes utilizados en la técnica, el porcentaje de espermatozoides anormales se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides anormales observados}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de espermatozoides observados}} \times 100$$

### f) Evaluación de la integridad del acrosoma.

La evaluación de la integridad del acrosoma de los espermatozoides se realizó mediante el método propuesto por Awad y Graham (2004), con ciertas modificaciones:

- ✓ En un tubo de ensayo de 2 mL. Se realizó la adición de 50 uL. De muestra espermática en 500 uL de solución de citrato de formalina (96 mL de citrato de sodio al 2.9%; 4 mL de formalina al 37%) y se mezclaron cuidadosamente.
- ✓ Con ayuda de una jeringa adosada con un tip de 5 uL, se aspiró y se colocó una gota de la mezcla sobre una lámina porta-objetos cubriéndose con una laminilla cubre-objetos, dejándose reposar por un minuto.
- ✓ 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 acrosoma normal 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 porcentaje.

### 3.3.1.4 Congelación de espermatozoides del epidídimo

#### a) Dilución.

Una vez determinada 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) 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.

#### b) Enfriamiento

La criopreservación de semen ovino emplea el protocolo de congelación lenta con descongelación rápida, este protocolo está conformado por el proceso de enfriamiento, el proceso de congelamiento y el proceso de descongelamiento (Santiani, 2003). El enfriamiento se da en dos fases, en la primera fase el semen diluido es enfriado hasta temperaturas de 5°C y

en la segunda fase se permite la estabilización del semen diluido con la adición de sustancias crioprotectoras (Salamon y Maxwell, 2000).

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. La adición de la fracción B se efectuó en tres partes y muy lentamente con espacios de cada 15 min.

### **e) 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 tecno por graduada a 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 del 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.

## **3.3.2 Para la fertilización *In vitro*.**

### **3.3.2.1 Obtención de óvulos.**

#### **a) Colección de ovarios**

- ✓ En el matadero, se juntaron los ovarios en un termo con suero salino y Penicilina G Procaínica (COMBIPEN) a una temperatura de  $36 \pm 1$  °C.
- ✓ Los ovarios, colectados de hembras faenadas fueron transportados en termos que contienen suero salino tibio y el antibiótico.

- ✓ En el laboratorio, se retiraron los ovarios del termo y fueron lavados con agua corriente a 37°C una vez y luego enjuagados 3 veces con suero salino a 37°C.
- ✓ Se Mantuvieron los ovarios durante todo el tiempo con suero salino tibio.

#### **b) Recuperación de los complejos cumulus-ovocitos (COCs)**

- ✓ La aspiración de los ovocitos, se realizó aproximadamente dentro de 4 a 6 horas después de faenado de los animales.
- ✓ Se aspiraron los COC desde los folículos ováricos y se colocó el fluido folicular en un tubo de centrífuga de 5 ml, manteniéndolo durante todo el tiempo a 37 °C.
- ✓ Se dejó decantar por 10 minutos y luego se aspiró el sobrenadante y se examinó bajo el estereoscopio en una placa Petri (Falcon 1029).

#### **c) Lavado y selección de los COC**

- ✓ Se prepararon 3 placas Petri (Falcon 1029) con TALP-HEPES solución de trabajo y se mantuvieron a temperatura de laboratorio o sobre una platina temperada. Se cuidó de que no se evapore el medio.
- ✓ Se juntaron todos los COC en una placa con TALP-HEPES.
- ✓ La selección de óvulos viables se realizó de acuerdo a la clasificación indicada por Brackett y Zuelke (1993), observando en el microscopio estereoscópico de contraste de fases.

### **3.3.2.2 Preparación de espermatozoides**

#### **a) Descongelación de espermatozoides**

- ✓ 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 segundos.

- ✓ 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.

#### **b) Evaluación espermática post descongelación.**

Las muestras espermáticas descongeladas fueron evaluadas en motilidad masal, individual, Test hipo osmótico, vitalidad, anormalidades e integridad de acrosoma, mediante las técnicas descritas anteriormente.

#### **c) Preparación de pajillas.**

Se utilizó semen congelado en pajillas para la IVF (congelado epididimal), mediante el método de SWIM-UP.

##### **SWIM-UP**

- ✓ Se prepararon tubos de 1.8 mL de capacidad con 1 mL de SPERM-TALP. Colocándolo dentro de la incubadora (5% CO<sub>2</sub>, 39° C, alta humedad atmosférica) con la tapa suelta por 1h.
- ✓ Se descongelaron 2-4 pajuelas (35°C 30 seg.) y se juntaron en un tubo.
- ✓ Se depositaron cuidadosamente en el fondo de cada tubo con SPERM-TALP 250 µL de semen (1 pajuela).
- ✓ Se mantuvieron los tubos a 39°C por 1 hora, para permitir a los espermatozoides nadar hacia arriba (swim up).
- ✓ Se retiró cuidadosamente 800 µL aproximadamente de sobrenadante de cada tubo y se juntaron en un tubo de 15 mL, se descartó 200 µL del fondo del tubo.
- ✓ Se realizó la centrifugación a 1000 rpm/10 min.

- ✓ Se descartó el sobrenadante y se dejó aproximadamente 400  $\mu\text{L}$  del fondo
- ✓ Se determinó la motilidad y la concentración.

### 3.3.2.3 La fecundación *In vitro*

#### a) Maduración *In vitro* (IVM).

- ✓ Los COC fueron madurados en placas petri, en gotas (10 COC/ 50  $\mu\text{L}$  de medio) de medio de maduración cubiertas con 10 mL de aceite mineral. Estas placas fueron colocadas en una estufa de cultivo en una atmosfera que contiene 5%  $\text{CO}_2$ , 39°C y 95% humedad, por 24h.
- ✓ Una vez madurados los COC, éstos fueron lavados (TALP-HEPES) y colocados en gotas (10 COC / 50  $\mu\text{L}$  de medio fecundación). A este medio, conocido como FERT-TALP modificado, se le agregó heparina para la capacitación espermática, penicilinahypotaurina – epinefrina (PHE) y una concentración de espermatozoides conocida de acuerdo al reproductor que se utilizó. Los COC se mantuvieron en co-cultivo con los espermatozoides por 6 a 18h.
- ✓ Para lo cual, el semen fue lavado previamente para eliminar el líquido seminal o diluyente y obtener un pellet solamente con espermatozoides mediante el método de “swim-up” y su lavado posterior por centrifugación. Esta técnica permitió que los espermatozoides más móviles “naden hacia arriba”. La concentración de los espermatozoides más frecuente utilizada fluctúa entre 1- 2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides / mL.

#### b) Desarrollo *In vitro* (IVC).

- ✓ Una vez concluido el co-cultivo (ovocitos-espermatozoides), los ovocitos fueron lavados (TALP-HEPES) y posteriormente cambiados al medio de desarrollo que consiste en un medio químicamente definido o un medio de cultivo celular, ya sea usando

células de la granulosa, o células epiteliales del oviducto.

- ✓ En el caso de co-cultivo, los cigotos son co-cultivados en TCM 199 adicionado con 10% de suero fetal más células del oviducto (15 – 20 cigotos/ 100  $\mu$ L de medio). Las placas fueron mantenidas por 7 a 9 días en una estufa de cultivo con 5% CO<sub>2</sub>, 39°C y 95% humedad, para la producción de blastocistos.

### 3.3.3 Análisis estadístico

Mediante el análisis descriptivo se determinó la media y la desviación estándar expresados en porcentaje para los diferentes parámetros de la viabilidad espermática en estudio antes de la congelación y después de la descongelación, los resultados obtenidos fueron transformados en valores angulares para el Análisis de Variancia (ANVA) utilizando el diseño bloque completamente al azar, y las diferencias de promedios fueron analizados por la prueba estadística de Tukey. La determinación se realizó mediante el Software estadístico de S.A.S, versión 9.0.

### 3.3.4 Diseño estadístico

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijkl} \quad \left\{ \begin{array}{l} i = j = k = 1, 2 \\ l = 1, 2, 3, 4 \end{array} \right.$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  : Es la variable de respuesta (motilidad masal, individual...)

$\mu$  : Es la media poblacional o constante común.

$\alpha_i$  : Es el efecto del i-ésimo manejo (Antes, después).

$\beta_j$  : Es el efecto del j-ésimo edad (4dientes, boca llena)

$\gamma_k$  : Es el efecto del k-ésimo técnica (T1 y T2)

$\varepsilon_{ijkl}$  : Es el error experimental aleatorio.



## CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 Capacidad fecundante de espermatozoides colectados del epidídimo.

## 4.1.1 Fertilidad espermática antes de la congelación y después de la descongelación.

Los resultados sobre el estudio de la fertilidad espermática antes de la congelación y después de la descongelación de los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo por lavado retrógrado y corte se muestran en la tabla 4.

Tabla 4  
*Fertilidad espermática de muestras colectadas de la cola del epidídimo de ovinos antes y pos congelación*

Parámetros	Min-Max	Antes de la congelación	Min-Max	Después de la descongelación
		(n=16)		(n=16)
Motilidad masal	42-70	57,30 <sup>a</sup>	38-60	50,10 <sup>b</sup>
Motilidad individual	40-66	54,90 <sup>a</sup>	32-63	47,90 <sup>b</sup>
Test Hipo osmótico (Host)	40-56	46,60 <sup>a</sup>	36-52	43,50 <sup>b</sup>
Vitalidad	40-76	49,50 <sup>a</sup>	38-65	47,80 <sup>a</sup>
Porcentaje de anormalidades	14-24	19,10 <sup>a</sup>	14-24	18,90 <sup>a</sup>
Integridad de acrosoma	60-74	67,70 <sup>a</sup>	54-72	64,90 <sup>a</sup>

En la tabla 4, se observa que las características de la viabilidad espermática con respecto a la motilidad masal fue de 57,30 % con valores mínimos y máximos de 42-70 % antes de la congelación y de 50,10 % con valores mínimos y

máximos de 38-60 % después de la descongelación estos datos al análisis de variancia (anexo 1) resultaron con diferencias estadísticas significativa ( $p < 0.05$ ), los mismos que a la prueba estadística (anexo 2) se determinó que la motilidad masal antes de la congelación fue superior con respecto a los espermatozoide después de la descongelación; En cuanto a la motilidad individual fue 54,90 % con valores mínimos y máximos de 40-66 % antes de la congelación y después de la descongelación fue 47,90 % con valores extremos de 32-63 %, estos valores al análisis de variancia (anexo 3) resultaron con diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) los cuales a la prueba estadística de Tukey (anexo 4) fue superior en los espermatozoides antes de la congelación con respecto a los espermatozoides después de la descongelación.

El test Hipo-osmótico fue 46,60 % con valores extremos de 40-56 % para espermatozoides antes de la congelación, mientras que para espermatozoides después de la descongelación fue 43,50 % con valores extremos de 36-52 %, estos resultados al análisis de variancia (anexo 5) resultaron con diferencias estadísticas significativas, los mismos que a la prueba estadística (anexo 6) fue superior en los espermatozoides antes de la congelación con respecto a los espermatozoides después de la descongelación, lo que significa que durante el manejo de los espermatozoides en la congelación- descongelación afectaron negativamente en estas características espermáticas.

Por otro lado, el porcentaje de vitalidad de los espermatozoides antes de la congelación fue 49,50 % con valores extremos de 40-76 % y después de la descongelación fue 47,80 % con valores extremos de 38-65 % sin diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) al análisis de variancia (anexo 9); el porcentaje de anormalidades espermáticas fue 19,10 % con valores extremos de 14-24% antes de la congelación y 18,90% con valores extremos de 14-24% después de la descongelación, estos valores al análisis de variancia (anexo 10) resultaron sin diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ); en la evaluación de la integridad de acrosoma de los espermatozoides en la tabla 3, se determina que antes de la congelación fue 67,70% con valores extremos de 60-74% y 64,90% con valores extremos de 54-72% después de la descongelación, los cuales al análisis de variancia (anexo 11) no tienen diferencias estadísticas significativas ( $P > 0.05$ ), lo que significa que las características espermáticas no están

influenciadas por el proceso de congelación y descongelación manteniéndose en porcentajes similares.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo para el porcentaje de motilidad basal de 57,30% en promedio antes de la congelación y 50,10% en promedio después de la descongelación son inferiores a los reportes existentes sobre ésta característica espermática, diferencias que se deben a que los trabajos fueron ejecutados en otros lugares donde los factores de clima sean diferentes al lugar de estudio del presente trabajo; sin embargo, se ha demostrado que el proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides tienen efecto negativo sobre la motilidad masal, similares resultados reportan Kaabi *et al.* (2003), quienes recolectando espermatozoides de la cola del epidídimo de carneros después de 24 horas pos-mortem determinaron la motilidad masal de 69,1 % y 52,3 % antes y después de la congelación respectivamente, en otro estudio realizado por Shakeri *et al.* (2008), sobre el efecto del manejo de epidídimo sobre la calidad de espermatozoides recolectados pos-mortem en carneros determinaron una motilidad total de 58,1 % y 38,7 % antes y después de la congelación respectivamente, lo que se corrobora que la motilidad masal después de la descongelación es más baja con respecto a los espermatozoides antes de la congelación.

Resultados similares también determinaron Ehling *et al.* (2006), al estudiar espermatozoides del semen de carneros descongelados en la inseminación intrauterino en borregas cruzadas, encontrando antes de la congelación una motilidad total de  $79,7 \pm 0,1$  % éste valor después de la descongelación bajó en  $1 \pm 0.1$  %, aseverando que las características espermáticas se preservaron antes de la congelación pero fueron afectados por efecto del periodo de refrigeración a la descongelación por los diferentes procesos que involucra esta actividad.

En otras especies se reportan similares resultados, recientemente Quispe (2015), realizó trabajo de investigación en toros criollos con las mismas técnicas de recolección de espermatozoides realizados en el presente estudio (lavado retrógrado y corte de la cola epidídimo) y en las mismas condiciones de temperatura y equipo, determinando que la motilidad total fue de 80,06; 74,43 y 70,25 % ( $P > 0.05$ ) antes de la congelación para espermatozoides recolectados a

0, 12 y 24 horas respectivamente, 49,26; 26,41 y 24,92 % ( $P < 0.05$ ) después de la Congelación de los mismos.

Los resultados determinados en el presente trabajo de 54,90 % de motilidad individual antes de la congelación y de 47,90 % después de la descongelación, son superiores a los reportes existentes en relación a trabajos similares realizados en ovinos; sin embargo, los porcentajes de motilidad individual de espermatozoides recolectados desde la cola de epidídimo son afectados por el proceso de enfriamiento y de congelación-descongelación de los mismos, Kaabi *et al.* (2003), al realizar el estudio sobre los espermatozoides recolectados de la cola de epidídimo a las 24 horas después de la muerte de carneros determinaron que la motilidad individual fue de 46,5 % antes de la congelación y de 33,6 % después de la congelación, donde se manifiesta que existe baja en el porcentaje de motilidad espermática.

Similares resultados determinan Shakeri *et al.* (2008), al realizar estudios sobre los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo después de 24 horas *Post mortem* de carneros, reportan 21,4 % antes de la congelación y de 13,2 % después de la descongelación, donde se manifiesta que existe una baja en el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides después de la descongelación como consecuencia de los factores que no fueron manejados adecuadamente durante la congelación y descongelación como son: temperatura, luz, contacto con metal, contacto con agua, impurezas y bacterias, exposición prolongada al aire, que se deben tener en cuenta en el manejo de espermatozoides en este proceso (Evans & Maxwell, 1990).

Otros estudios también determinaron que el proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides reducen la motilidad individual de los espermatozoides, como se encontraron en toros criollos del altiplano de Puno reportado por Quispe (2015), quien al realizar la evaluación de la sobrevivencia y fertilidad *In vivo* de espermatozoides del epidídimo de toros post- mortem determinó que los valores del porcentaje de motilidad total, motilidad progresiva, concentración espermática fueron afectados por el proceso de congelación-descongelación, esto significa que los diferentes factores que intervienen en este proceso tienen efecto negativo en la sobrevivencia de los espermatozoides

colectados desde la cola del epidídimo; pero, no afectan mucho en su capacidad fecundante.

Los resultados del presente estudio sobre el porcentaje de Test Hipo-osmótico de los espermatozoides del epidídimo obtenidos por lavado retrógrado y corte con 46,60 % antes de la congelación y de 43,50 % después de la descongelación, son inferiores a los reportes existentes, diferencias que se deben a los lugares donde fueron ejecutados, sin embargo, se evidencia que existe influencia del manejo en congelación-descongelación de los espermatozoides sobre ésta característica espermática, éste efecto es corroborado por los trabajos de Kaabi *et al.* (2003), que en el estudio sobre el efecto de las condiciones de manejo en la calidad de los espermatozoides recolectados de la cola de epidídimo de carneros determinaron una HOS-test de 83,3 % antes de la congelación y de 53,7 % después de la congelación, por otro lado, Shakeri *et al.* (2008), en un estudio similar determinaron una HOS-test de 73,0 % antes de la congelación y de 47,9 % después de la congelación, éstas diferencias se atribuyen también a que dichos estudios fueron realizados en condiciones de manejo diferentes al presente estudio puesto que ellos consideraron una temperatura constante de 5 °C en el transporte de las muestras en tanto que en el presente estudio fue a temperatura de ambiente.

Otros autores como Evans & Maxwell (1990), en sus estudios han demostrado que la temperatura en el momento del manejo de las muestras testiculares son importantes, esta aseveración puede evidenciarse en el trabajo de Neild *et al.* (2006), quienes en su estudio de criopreservación de pares testiculares con recuperación de espermatozoides desde la zona de la cola de epidídimo, obtuvieron un Test Hipo-osmótico de 24,21 % en muestras conservadas a temperatura de ambiente y de 38,0 % en muestras conservadas en hielo, en el presente estudio no se tomó en cuenta este factor de estudio, sin embargo, los resultados son superiores a los reportes de los autores en mención.

En otras especies, estudios similares realizados en toros criollos del altiplano de Puno. Perú, mediante las mismas técnicas de recolección de espermatozoides y de manejo, Quispe (2015), determinó el Test Hipo-osmótico antes de la congelación de 69,72; 67,87 y 60,31 % ( $p > 0.05$ ) a los 0, 12 y 24 horas después de la muerte del toro y de 53,21; 31,99 y 27,47 % a los 0, 12 y 24 horas

respectivamente después de la congelación, cuyas diferencias se atribuyen al aspecto anatómico y fisiológico que difieren entre el toro y carnero, además de la temperatura constante en que realizó el estudio a 5 °C.

Los resultados del porcentaje de vitalidad de los espermatozoides obtenidos en el presente estudio de 49,50 % antes de congelación y de 47,80 % después de la descongelación, nos indica que existe la mitad de espermatozoides vivos en ambas condiciones de manejo, lo cual es importante en la preservación de valor genético a partir de espermatozoides recolectados de la cola de epidídimo después de la muerte repentina de reproductores de alto valor genético o de especies en extinción, no se encontró reportes referente a vitalidad espermática en especial.

Sin embargo, estudios realizados en el mismo laboratorio de reproducción que el presente, Quispe (2015), determinó la vitalidad espermática en espermatozoides de toro criollos antes de la congelación de 77,88; 73,29 y 74,41 % a los 0, 12 y 24 horas *Post mortem*, resultados que son superiores a los resultados obtenidos en el presente estudio, diferencias que se atribuye que el mencionado autor realizó el trabajo bajo condiciones de temperatura constante de 5 °C en el manejo de las muestras testiculares, en cambio el presente trabajo fue conducido a temperatura de medio ambiente que sería el efecto negativo para este valor.

Los resultados determinados para el porcentaje de espermatozoides anormales de 19,10 % con valores mínimos de 14 % y valores máximos de 24 % antes de la congelación y de 18,90 % y de 14 – 24% como valores mínimos y máximos después de la descongelación del presente estudio tienen valores superiores a los reportados por Kaabi *et al.* (2003), quienes en un estudio de la viabilidad de espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo, determinaron que después de 24 horas de muerto el animal el porcentaje de espermatozoides anormales fueron de 14.6 % antes de la congelación y 16.4 % después de la descongelación, diferencias que se deben a efecto del manejo de las muestras dichos autores trabajaron a una temperatura constante de 5 °C, mientras que nuestro trabajo fue realizado a temperatura de ambiente.

Por otro lado los resultados del presente estudio son inferiores a los reportes de Shakeri *et al.* (2008), quienes realizaron el estudio del efecto del manejo de epidídimo sobre la calidad de espermatozoides recolectados *Post mortem* en

carneros, determinando que a las 24 horas después de muerte del animal, el porcentaje de espermatozoides anormales fueron de 25,0 % antes de congelación y 35,1 % después de la congelación, cuyas diferencias son debidas a que los estudios se realizaron en diferentes medios donde las condiciones medio ambientales sean también diferentes.

En otras especies se reportan también resultados sobre el porcentaje de espermatozoides anormales, así, Quispe (2015), realizando el estudio de la evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides del epidídimo de toros criollos, bajo condiciones del altiplano de Puno lugar donde se realizó el presente estudio, determinó que el porcentaje de anomalías totales antes de la congelación fue de 28,28; 35,08 y 34,01 % para 0, 12 y 24 horas *Post mortem* respectivamente, estos resultados son superiores a los resultados del presente estudio lo que es debido por diferencia de especie.

Los resultados encontrados en el estudio de 67,70 % antes de la congelación y 64,90 % después de la descongelación en el porcentaje de la integridad de acrosoma, son inferiores a los reportes de Shakeri *et al.* (2008), quienes realizando estudios de viabilidad de espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo de carneros 24 horas *Post mortem* reportando 67,2 % y 38,7 % antes y después de la congelación respectivamente; en cambio Kaabi *et al.* (2003), en un estudio similar al anterior determinó 78,4 % antes de la congelación y 55,4 % después de la congelación los cuales son superiores a los resultados del presente trabajo, diferencias que se deben al lugar de estudio que son distintos.

Estudios realizados en otras especies también demostraron similares resultados para el porcentaje de la integridad de acrosoma espermática, Quispe (2015), realizando el trabajo de investigación en condiciones de clima y temperatura del altiplano peruano (Puno) en espermatozoide recolectados de la cola de epidídimo de toros Criollo determinó 62,18; 64,83 y 59,51 % ( $p > 0.05$ ) a los 0, 12 y 24 horas respectivamente antes de la congelación y 48,33; 28,90 y 23,87 % a los 0, 12 y 24 horas *Post mortem* después de la congelación.

#### 4.1.2 Fertilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte.

Los resultados de las características de fertilidad de los espermatozoides con respecto a la técnica de colección desde la cola del epidídimo a través del lavado retrógrado y mediante corte modificado se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 5  
*Fertilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte.*

Parámetros	Min-Max	Lavado retrógrado	Min-Max	Corte modificado
		(n=16)		(n=16)
Motilidad masal	38-70	53,19 <sup>a</sup>	40-70	54,23 <sup>a</sup>
Motilidad individual	38-66	49,88 <sup>a</sup>	32-66	52,89 <sup>a</sup>
Test Hipo osmótico (Host)	36-56	43,38 <sup>b</sup>	38-56	46,75 <sup>a</sup>
Vitalidad	38-51	46,28 <sup>a</sup>	38-76	51,08 <sup>a</sup>
Porcentaje de anormalidades	18-24	19,70 <sup>a</sup>	14-21	18,33 <sup>a</sup>
<u>Integridad de acrosoma</u>	54-74	66,38 <sup>a</sup>	60-74	66,25 <sup>a</sup>

Los espermatozoides obtenidos por lavado retrógrado tienen un porcentaje de motilidad masal de 53,19% con valores mínimos y máximos de 38-70 % y los colectados por corte modificado de 54,23 % con valores mínimos y máximos de 40-70 %, los cuales al análisis de variancia (anexo 1) no se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ), lo que significa que el porcentaje de motilidad masal no está influenciado por la técnica de colección; en cuanto a la motilidad individual de los espermatozoides fue de 49,80% con valores mínimos y máximos de 38-66% para los obtenidos por lavado retrógrado y de 52,89% con valores extremos de 32-66 % para los obtenidos por corte, estos datos al análisis de variancia (anexo 3) no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ), igualmente indica la técnica de colección de espermatozoides no tiene efecto sobre ésta característica espermática.

El test Hipo-osmótico de los espermatozoides colectados por lavado retrógrado fue de 43,38% con valores mínimos de 36 % y valores máximos de 56 % y para los obtenidos por corte modificado fue de 46,75% con valores mínimos y



máximos de 38-56 %, los cuales al análisis de variancia (anexo 5) se encontró diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) que además de someter a la prueba estadística (anexo 8) se determinó que los espermatozoides obtenidos por corte del epidídimo fueron superiores con respecto a los obtenidos por lavado retrógrado, lo que indica que el test Hipo-osmótico de los espermatozoides colectados por corte tienen mejores condiciones de permeabilidad plasmática.

El porcentaje de vitalidad de los espermatozoides obtenidos por lavado retrógrado fue de 46,28% con valores mínimos y máximos de 38-51 % y 51,08% con valores mínimos y máximos de 38-76 % para los colectados por corte, los cuales al análisis de variancia (anexo 9) no se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ); el porcentaje de anomalías espermáticas en los espermatozoides obtenidos por lavado retrógrado fue de 19,71% con valores mínimos y máximos de 18-24 % y para los obtenidos por corte fue de 18,33% con valores mínimos y máximos de 14-21 %, igualmente al análisis de variancia (anexo 10) no se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ); similarmente la integridad de acrosoma no fue influenciada por los métodos de colección de espermatozoides cuyo resultado fue de 66,38% con valores mínimos y máximos de 54-74 % para los obtenidos por lavado retrógrado y de 66,25% con valores mínimos de 62 % y valores máximos 74 % para los obtenidos por corte, sin diferencias estadísticas significativas al análisis de variancia (anexo 11), lo que evidencia que estas características espermáticas no están influenciadas por los métodos de colección de los espermatozoides desde el epidídimo de los carneros.

Los resultados de porcentaje de motilidad masal determinados para espermatozoides obtenidos por la técnica de lavado retrógrado de 53,19% y de 54,23% para espermatozoides obtenidos por el método de corte, mantienen el porcentaje de la motilidad masal en la misma proporción, aunque las técnicas de criopreservación reducen los parámetros de calidad espermática, se mantiene la viabilidad de los espermatozoides, como han demostrado, Ribeiro-Peres *et al.* (2014), utilizando la técnica de flujo retrógrado desde la cola de epidídimo de toros después de la muerte, determinando una motilidad media de 74, 29 y 25 % en espermatozoides frescos, congelados por técnica convencional y automatizado respectivamente.

En el presente estudio la técnica de recolección de los espermatozoides desde la cola de epidídimo (lavado retrógrado y corte) no tienen influencia en la motilidad masal, el mismo que es corroborado por Martínez *et al.* (2006), quienes al evaluar dos métodos de obtención de espermatozoides del epidídimo de venados rojos de Iberia por corte e insuflación, manifiestan que los resultados de la calidad espermática no tienen diferencia significativa entre los dos métodos reportando una media de  $439,7 \times 10^6$  y  $648 \times 10^6$  de espermatozoides para métodos de corte e insuflación respectivamente. Por lo que se deduce que en la colección de espermatozoides desde la cola del epidídimo se debe utilizar la técnica de lavado retrógrado o la técnica de corte modificado indistintamente para el manejo en las técnicas reproductivas de los ovinos.

El porcentaje de motilidad individual determinado para los espermatozoides obtenidos por lavado retrógrado de 49,88% y para los espermatozoides colectados por la técnica de corte de 52,89% son valores que se consideran altas para espermatozoides congelados y descongelados bajo condiciones de laboratorio y clima del altiplano, no se ha encontrado otros estudios para la motilidad individual en ovinos por lo que se considera como primer reporte.

En otras especies como el estudio realizado por Garde *et al.* (1992), sobre el efecto de tres medios crio-protectores en células espermáticas de diferente calidad obtenidas post mortem del epidídimo de ciervos, determinaron la motilidad individual de 35,0 % en un medio citrato-fructosa, 58,6 % en medio tris-lactosa y 49,2 % en tryladil en espermatozoides considerados de alta calidad, cuyos resultados manifiestan que la motilidad individual de los espermatozoides recolectados a partir de la cola del epidídimo de carneros después de su muerte son manejables para su conservación.

Los datos encontrados para el test Hipo-osmótico de 43,38% para los espermatozoides obtenidos por la técnica de lavado retrógrado y 46,75% para espermatozoides obtenidos por la técnica de corte, otros autores confirman los resultados obtenidos en el presente estudio, pero no necesariamente en ovinos aunque encontraron mejores tasas de espermatozoides reaccionados, que la integridad funcional de la membrana espermática se mantiene estable durante el periodo de la manipulación de los testículos, pero están influenciadas

significativamente por el proceso de la congelación, igualmente los espermatozoides colectados por la técnica de lavado retrógrado fue superior con relación a lo colectado por corte modificado, debido a que en la primera técnica interviene un dilutor en su colección en cambio en el corte es directo.

#### 4.1.3 Fertilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte según edad del carnero

Las características de fertilidad de los espermatozoides obtenidos por lavado retrógrado y corte del epidídimo correspondientes a carneros de 2 años y de 3 años se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 6  
*Fertilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte, según edad del carnero*

Parámetros	Min-Max	2 años	Min-Max	3 años
		(n=16)		(n=16)
Motilidad masal	38-70	51,94 <sup>a</sup>	38-70	55,23 <sup>a</sup>
Motilidad individual	32-66	48,76 <sup>a</sup>	38-66	54,08 <sup>a</sup>
Test Hipo osmótico (Host)	36-52	42,13 <sup>b</sup>	38-56	48,00 <sup>a</sup>
Vitalidad	38-76	47,13 <sup>a</sup>	44-58	50,23 <sup>a</sup>
Porcentaje de anormalidades	14-24	19,46 <sup>a</sup>	15-20	18,58 <sup>a</sup>
Integridad de acrosoma	54-74	64,44 <sup>b</sup>	62-74	68,19 <sup>a</sup>

La tabla 6, presenta datos de motilidad masal expresados en porcentajes el mismo que en los espermatozoides procedentes de carneros de 2 años fue de 51,94% con valores mínimos de 38 % y máximo de 70 % y de 55,23% con valores mínimos y máximos de 38-70 % para espermatozoides de carneros de 3 años, los cuales al análisis de variancia (anexo 1) no mostraron diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ); en tanto que el porcentaje de la motilidad individual para los espermatozoides obtenidos de carneros de 2 años fue de 48,76% con valores mínimos de 32 % y 66 % como valores máximos y de 54,00% para los obtenidos de carneros de 3 años, los cuales al análisis de variancia (anexo3) no mostraron diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ), lo que significa el porcentaje

de motilidad masal ni el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides están afectados por la edad del carnero, porque ambas edades están en condiciones de proveer semen de calidad para la monta y/o inseminación artificial.

Por otro lado el test Hipo-osmótico de los espermatozoides obtenidos de los carneros de 2 años tuvieron un 42,13% con valores mínimos y máximos de 36-52 % y 48,00% con valores mínimos y máximos de 38-56 % para los obtenidos de los carneros de 3 años, estos datos al análisis de variancia (anexo 5) se encontró una diferencia estadística altamente significativa ( $p < 0.01$ ), los cuales a la prueba estadística se evidenció que fueron superiores los provenientes de carnero de 3 años con respecto a los obtenidos de carneros de 2 años, el mismo que indica que el test hipo-osmótico de los espermatozoides están determinadas por la edad de reproductor macho, evidenciándose que los ovinos de mayor edad ofrecen mejores condiciones para ésta característica.

El porcentaje de vitalidad de los espermatozoides obtenidos de los carneros de 2 años fue de 47,13% con extremos de 38-76 % y para los obtenidos de carneros de 3 años fue de 50,23% con valores extremos de 44-58 %, estos datos al análisis de variancia (anexo 9) no mostraron diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ); para el porcentaje de anomalías espermáticas en los obtenidos de carneros de 2 años fue de 19,46% con valores extremos de 14-24 % y de 18,58% con valores extremos de 15-20 % para los obtenidos de los carneros de 3 años, los que al análisis de variancia (anexo 10) no se encontró diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ), lo que significa que estas características no están influenciadas por la edad de los reproductores, por lo que ambas edades en el estudio ofrecen similares condiciones de calidad espermática.

En cambio, el porcentaje de espermatozoides con integridad de acrosoma están afectadas por la edad de los carneros donde los animales de 2 años tuvieron de 64,44% con valores mínimos y máximos de 54-74 % y de 68,19% con valores extremos de 62-74 % para los obtenidos de carneros de 3 años, estos resultados al análisis de variancia (anexo 11) mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), los mismos que a la prueba estadística de Tukey (anexo 12) se determinó que los obtenidos de carneros de 3 años fueron superiores a los

procedentes de carneros de 2 años, esto indica la edad de los animales tienen efecto sobre la integridad de acrosoma de los espermatozoides, donde se manifiesta que los obtenidos de los carneros de 3 años son considerados como mejores para ésta característica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio considerando la edad de los reproductores es la primera, puesto que otros autores trabajaron sin tomar en cuenta la clase animal, al respecto los datos de la tabla 5, evidencian que no existen influencias de la edad sobre el porcentaje de motilidad masal, motilidad individual, vitalidad y porcentaje de anormalidades en los espermatozoides obtenidos desde la cola del epidídimo mediante lavado retrógrado y corte; sin embargo, el test Hipo-osmótico e integridad del acrosoma tuvieron influencias por la edad de los animales, donde se encontraron que los ovinos de 3 años son superiores con respecto a los carneros de 2 años, lo que sugiere que sería recomendable trabajar con machos adultos desde los 3 años de edad.

## 4.2 Fertilización *In vitro*

### 4.2.1 Óvulos fertilizados

Los resultados de la cantidad de óvulos fertilizados *In vitro* con espermatozoides después de la descongelación se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 7  
*Óvulos fertilizados con espermatozoides obtenidos del epidídimo por lavado retrógrado y corte, a la descongelación.*

GRUPOS	n	óvulos fertilizados	
		N°	(%)
Lavado retrogrado	28	25	89,28
Corte modificado	27	24	88,89
Edad 2 años	27	24	88,89
Edad 3 años	28	25	89,28

En la tabla 7, se observa que el 89,28 % de óvulos utilizados para el estudio lograron fertilizarse con los espermatozoides colectados mediante la técnica de lavado retrógrado y 88,89% con los espermatozoides colectados mediante corte

modificado, igualmente los espermatozoides procedentes de carneros de 2 años fertilizaron a 88,89% de óvulos utilizados mientras que los espermatozoides procedentes de carneros de 3 años de edad lograron fertilizar a 89,28%, estos resultados sometidos al análisis de variancia (anexo 13), no se determinó diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ), para los grupos en estudio, lo que significa que ni la edad de los carneros ni la técnica de colección de espermatozoides tienen influencia sobre la cantidad de óvulos fertilizados, es decir los espermatozoides utilizados en el presente estudio tienen la misma capacidad de fertilización.

Los resultados de fertilidad *In vitro* logrados con espermatozoides obtenidos desde la cola de epidídimo mediante lavado retrógrado y corte, según la tabla anterior se manifiesta que un alto porcentaje de óvulos madurados mediante cultivo lograron fertilizarse, éstos datos son superiores a los reportes de Kaabi *et al.* (2003), quienes realizando el estudio de la capacidad fecundante de los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo de carneros adultos a los 24 horas después de la muerte y otro grupo control con semen fresco de eyaculación normal, lograron 58 % de fertilidad *In vitro* con espermatozoides del epidídimo y 50 % de fertilidad *In vitro* con semen de eyaculación normal, cuyas diferencias son debidas a diferentes condiciones distintos del lugar de ejecución y sobretodo los resultados del presente estudio es a nivel de laboratorio.

En el presente estudio no se encontró diferencias estadísticas en la fertilización de los óvulos madurados *In vitro*, utilizando espermatozoides descongelados obtenidos por dos métodos y de dos edades de machos, esto significa que se puede trabajar con cualquiera de las dos técnicas así con machos sin considerar la edad, aunque los espermatozoides obtenidos de animales adultos ofrecen mejores condiciones de viabilidad espermática, similares resultados determinaron Shakeri *et al.* (2008), manifestando que no existe diferencia estadística significativa entre los resultados de fertilización *In vitro* con semen fresco de eyaculación y espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo después de 24 horas de muerte del animal 50 % y 58 % de fertilidad *In vitro* con semen fresco y espermatozoides del epidídimo respectivamente, Byrd *et al.* (1996), lograron una fertilización *In vitro* de 58,62 % en ovinos, igualmente Benavides *et al.* (2015), reportan una tasa de fertilización *In vitro* con espermatozoides del epidídimo de

71,4 % para espermatozoides obtenidos por aspiración y 61,0 % para los obtenidos por disección en vacunos, resultados que manifiestan que los espermatozoides recolectados desde la cola del epidídimo tienen alta calidad de fertilización.

Los resultados del trabajo de investigación son superiores también a los reportados por Robledo *et al.* (2009), quienes trabajando con ovarios de ovinos recuperados del beneficio de los animales desde el camal, probaron dos medios de maduración de los oocitos determinando la tasa de maduración *in vitro* (MIV) de 73,3 % en medio HECM-9 y de 71,4 % en medio TCM-199 sin diferencias estadísticas, la tasa de fertilización *In vitro* (FIV) fue diferente entre tratamientos, observando mejor respuesta de los oocitos madurados en HECM-9 47,7 % respecto a los madurados en medio TCM-199 con 28.6 %; similares resultados determinaron Martínez *et al.* (2011), quienes realizaron el trabajo de investigación con ovarios de cabras y con la misma metodología y medio de maduración que los anteriores investigadores, encontrando la tasa de maduración *in vitro* (MIV) y la tasa de fertilización (FIV) lo que fue superior en el medio de HECM-9 84,8 % y 19,18 % respectivamente, que en TCM-199 que fue 62,7 % y 9,59 %, respectivamente; dichas diferencias se deben a que los autores anteriores realizaron trabajos con medios de maduración en prueba, en cambio en el presente estudio se realizó con medios de maduración ya comprobados en otras especies y sobre todo con control minuciosos en los factores de medio de trabajo a nivel de laboratorio por lo que se logró fertilizar a la totalidad de óvulos en estudio.

También existen reportes del manejo de los espermatozoides recolectados desde la cola del epidídimo en la fertilización *In vivo* en ovinos, Ehling *et al.* (2006), utilizando espermatozoides descongelados del epidídimo en la inseminación artificial logró una tasa de parición de 87,5 %, Fournier-Delpech *et al.* (1979), realizaron inseminación artificial en borregas con espermatozoides de la cola del epidídimo y semen fresco logrando una fertilidad *In vivo* de 80 % con espermatozoides del epidídimo y 72 % con semen fresco controladas mediante concentraciones de progesterona sanguínea, igualmente, Fournier- Delpech *et al.* (2001), en la inseminación de borregas con espermatozoides de la cola del epidídimo lograron una tasa de gestación de 78-80 %, resultados que corroboran lo alcanzado en el presente estudio la alta calidad de fertilización de los

espermatozoides congelados-descongelados procedentes de la cola del epidídimo después de la muerte del animal.

En otras especies se reportan resultados similares, Costa *et al.* (2011), utilizando espermatozoides del epidídimo recuperados tres días después de la muerte del toro lograron el 20 % de gestación determinadas por ultrasonografía, Amann y Griel (1974), sacrificando vacas a los 4 días del ciclo estral determinaron una fertilidad de óvulos en 0 % para espermatozoides testiculares, 84 % para espermatozoides del epidídimo y 94 % para semen eyaculado, Soler *et al.* (2003), utilizando espermatozoides de la cola del epidídimo del ciervo Ibérico en la inseminación con celo sincronizado determinaron una fertilidad *In vivo* de 56 %. Resultados que son inferiores a los encontrados en el presente estudio, los cuales se deben a las diferencias existentes en el manejo y condiciones de ambiente diferentes al presente estudio.

En porcinos Martínez *et al.* (2006), determinaron que espermatozoides colectados del epidídimo, almacenados por un día a 4 °C y luego congelados tenían la habilidad para producir crías, donde oocitos madurados *In vitro* y fertilizados *In vitro* fueron transferidos logrando el nacimiento de 5 crías normales; igualmente en vacunos Quispe (2015), trabajando con espermatozoides colectados desde la cola del epidídimo y con el mismo procedimiento del presente trabajo lograron una fertilidad de 69,2 % (9/13) diagnosticadas por ecografía entre los días 30 – 35 días después de la inseminación, resultados que afirman que los espermatozoides colectados de la cola de epidídimo tienen una alta capacidad de fecundación como se ha logrado en el presente estudio.

#### **4.2.2 Embriones en fase de mórula.**

La cantidad de embriones en la fase de mórula obtenidos después de la fertilización *In vitro* de óvulos con espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo obtenidos por lavado retrógrado y corte se detallan en la siguiente tabla.



Tabla 8

*Porcentaje de embriones en la fase de mórula después de 4 días de la fertilización In vitro.*

GRUPOS	embriones viables		
	n	N	(%)
Lavado retrogrado	28	23	82,14
Corte modificado	27	22	81,48
Edad 2 años	27	22	81,48
Edad 3 años	28	23	82,14

Los embriones en la fase de mórula obtenidos en la fertilización de óvulos *In vitro* se mantienen en porcentajes altas: para espermatozoides obtenidos por lavado retrógrado fue 82,14 % y 81,48 % para espermatozoides colectados por corte de la cola del epidídimo, además, se observa que los embriones con espermatozoides procedentes de carneros de 2 años fue 81,48 % de embriones viables y embriones con espermatozoides obtenidos de carneros de 3 años fue de 82,14 %, estos resultados al análisis de varianza (anexo 14) se determinó que no existe diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) entre los indicadores en estudio; lo que significa que la edad de los carneros no influyen en la cantidad de embriones igualmente la técnica de recolección de espermatozoides tienen efecto, lo que indica además se logró un alto porcentaje de óvulos fertilizados alcanzaron a la fase de mórula aptas para realizar la transferencia.

Trabajos similares efectuados en vacunos por Benavides *et al.* (2015), evaluando la fertilidad de espermatozoides recolectados por aspiración y disección del epidídimo, lograron una fertilidad de 71,4 y 61,0 % para método de aspiración y disección respectivamente ( $P < 0.05$ ), y sin diferencia significativa en la tasa de blastocistos al día 7 y 9 post-fecundación; Byrd *et al.* (1996), evaluando la maduración de ovocitos de ovinos en una incubadora portátil de plástico determinaron una fertilidad de 58,62 %, la tasa de desarrollo de mórula fue de 16,94 % y la tasa de desarrollo de blastocisto fue de 3,06 %. Los reportes de los autores mencionados refuerzan los resultados del presente trabajo donde se logró el desarrollo de la totalidad de los óvulos fecundados a la fase de mórula, no

habiendo realizado el seguimiento las fases sub-siguientes. Trabajos de investigación realizadas en la comparación de fertilidad de semen fresco y espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo tienen similar comportamiento en la fertilización, así, Igboeli y Foote (1968), demostró que en la inseminación de 100 vacas con toros de historia conocidos, los inseminados con espermatozoides recolectados 60 horas después de la muerte tuvieron 69 % de tasa de no retorno dentro de 60 – 90 días, en cambio las inseminadas con semen antes de la muerte de los toros presentaron una tasa de no retorno de 75% que fue ligeramente superior; de los cuales el resultado del presente estudio como los reportados por diferentes autores se puede aseverar que los espermatozoides de la cola del epidídimo son altamente fértiles.

Los resultados del presente trabajo de investigación realizados a nivel del altiplano de Puno son superiores a los reportes de Ayuque y Justiniano (2013), quienes trabajando con llamas en la región Huancavelica a 3680 msnm. Casi similar a la altitud donde se ejecutó el presente trabajo, logrando determinar el desarrollo embrionario por fertilización *In vitro* (FIV) en la fase de segmentación en 51,00 %, mórula 71,47 % y blastocisto en 11,64 % a los 36 horas, como también lograron determinar que el porcentaje de segmentación, mórula y blastocisto fue de 49,55 %; 76,69 % y 12,51 % respectivamente a los 42 horas, sin diferencias estadísticas entre tratamientos, cuyas diferencias se deben al factor especie y posiblemente también a la temperatura (38,5 °C), en presente estudio se trabajó a temperatura constante de 36,5 °C y se logró fertilizar a la totalidad lograr los embriones hasta la fase mórula.

Aun cuando existen numerosos trabajos sobre maduración *in vitro* (MIV), fertilización *In vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV), de oocitos en otras especies como bovinos, porcinos y caprinos los pocos estudios llevados a cabo en la especie ovina se consideran suficientemente destacables que han permitido alcanzar resultados satisfactorios y equiparables con otras especies, Gonzales (1993), reporta valores de 85 % de maduración *in vitro*, 55 % de fertilización *In vitro* y 25 % de cultivo *in vitro* de oocitos que finalmente lograron alcanzar la fase de blastocistos bajo condiciones de

laboratorio; igualmente Walker *et al*, (1988), mencionado por el mismo autor, manifiesta que, lograron una alta tasa de 81 % de desarrollo de embriones de una sola célula hasta la fase de blastocisto, empleando únicamente el medio sintético de oviducto (SOF-SH) y suero humano. Con los que se refuerza los resultados del presente estudio donde se ha logrado un alto porcentaje de embriones por fertilización *In vitro*.



## CONCLUSIONES

- La capacidad fecundante de los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo sufrieron una reducción a la descongelación en sus características de motilidad masal, motilidad individual y Test Hipo-osmótico, en cambio el porcentaje de vitalidad, anormalidades y la integridad de acrosoma no sufrieron tal efecto; ni la edad del carnero, ni las técnicas de obtención de los espermatozoides tuvieron efecto sobre éstas características.
- La capacidad de fertilización *In vitro* de los espermatozoides de la cola del epidídimo congelado-descongelados fue muy alta, demostrando tal condición hasta la fase de mórula sin influencias por la técnica de recolección de espermatozoides así como por la edad de los carneros.

### RECOMENDACIONES

- Según los resultados del presente trabajo, realizar la disección del epidídimo y colección de los espermatozoides dentro de las 24 horas.
- En el transporte de ovarios mantener una temperatura de 34 a 36 °C para mantener viable los óvulos a aspirar.
- Utilizar las técnicas de lavado retrógrado y corte modificado en la recolección de espermatozoides del epidídimo como técnicas de reproducción para la especie ovina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, E. (2006). *Anatomía de los Animales Domésticos: Sistema genital masculino*. Programa de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Bogotá, Colombia.
- Aguado, MJ., Garde, J., Madriadano, JM., Pérez, S., Garrido D. y Montoro V. (1994). Congelación post mortem de semen de epidídimo de morueco. In: *Proceedings of the 7th Jornadas Int. Reprod. Anim.* E IA, Murcia, Spain, p. 283.
- Alencastre, R. (1997). *Producción de Ovinos*. Impreso en los talleres gráficos de A & R Panamericana E.I.R.L. Arequipa-Perú.
- Allende, R. (2007). *La vida del esperma después de la espermatogénesis* (Equipo Técnico CIAVT).
- Amann, R. & Griel, L. (1974). Fertility of Bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymis, and ejaculated sperm. *J.Dairy Sci* 57:212-219.
- Amann, R. & Schanbacher, B. (1983). Physiology of male reproduction. *J.Anim. Sci.*, 57:380-403.
- An, T., Wada, S., Edashige, K., Sakural, T. & kasai, M. (1999). Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38, 27-34.
- Awad, M. & Graham, J. (2004). A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the cold Surface of cattle fat. *Anim.Reprod. S.c.*84:83-92.
- Ayuque, A. y Justiniano, E. (2013). Evaluación de diferentes tiempos para la maduración nuclear de ovocitos de llama (lama glama) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación in vitro. URI: <http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/752>
- Baracaldo, M., Barth, A. y Bertrand, W. (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](http://www.ivis.org)).
- Barrios, D. (2002). Evaluación de la Calidad y Capacidad Fecundante de Espermatozoides de la Cola del Epidídimo de Toros Post-mortem. *Memorias del XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal*. Venezuela.pp.1-14.
- Benavides L., Huanca, W. y Quintanilla, L. (2015). Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados *in vitro*. *Rev. Investig. Vet.* Perú vol. 26 n° 4.
- Brackett, B. & Zuelke, K. (1993). Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*. 39: 43-64.
- Brito I., Valencia, J., Balcázar, A., Angulo, R. y Mejía, O. (2004). Congelación de Semen de Carnero en Pellets con los Diluyentes Tris-glucosa-yema de huevo o Lactosa-yema de huevo. *Avances de investigación Agropecuaria*.
- Byrd, S., Flores, G. Applewhite, A. and Whestushin, M. (1996). *In Vitro* maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology*. 47: 857-864.
- Castelo, TS., Frota, T. y Silva, A. (2008). Considerações sobre a conservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet. Brasil* 2, 67-75.
- Costa, P., Martins, C., Franco, V., Rezende, L., Sereno, J. y Campos, H. (2011). Birth of normal calves after artificial insemination using cryopreserved spermatozoa obtained from refrigerated epididymis of death bovin. *Cienc Rural* 4(5):869-874.
- Del Campo, M. (1993). *Fertilización in vitro*. Instituto de Reproducción Animal Córdoba- Argentina- (IRAC). 1:1.20.
- Ehling, G., Rath, D., Struckmann, C., Frenzel, A., Schindler, L. y Niemanh, H. (2006). "Utilization of Frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in scrape susceptible sheep breeds. *Theriogenology* 66, 2160-264.
- Evans G., & Maxwell, W.M. (1990). *Salmons Artificial insemination of sheep and goats*. London: Butterwoth.192 p.
- Fournier-Delpech, S., Colas, G., Courot, M. Ortavant, R. and Brice, G. (1979). Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability, and embryonic survival after uterine insemination in the ewe. *Ann.Biol. Anim. Bioch Biophys*, 19 : 597-605.
- Fournier-Delpech, S., Colas, G., Courot, M., Ortavant, R. and Brice, G.. (2001). Epididymal sperm maturation in the ram: motility, fertilizing ability, and embryonic survival after uterine insemination in the ewe. *Ann.Biol. Anim. Biochem*

*Biophys.* 74: 21-129.

- Fuji, A.; Kaedei, Y., Tanihara, F., Ito, A., Hanatake; K., Kikuchi, K., Nagai, T. and Otoi, T. (2008). In Vitro Maturation and Development of Porcine Oocytes Cultured in a Straw or Dish Using a Portable Incubator with a CO<sub>2</sub> Chamber *Reprod. Dom Anim.* 45: 619-624.
- Fukui, Y. (1990). Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Rep. Dev* 26:40-46.
- Galina, C. (2008). *Reproducción de Animales Domésticos*. Tercera Edición. LIMUSA. Mexico.
- Garde J., Artiga, C., Gutiérrez, A., y Vásquez, I. (1992). "Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med. Vet.*;9:107-114.
- González, R. (1993). Técnicas de fertilización In Vitro de oocitos de ovinos. *Revista Científica, FCV-LUZ*. Vol. III, N° 3.
- Guthrie D., Liu, J., & Critser, K. (2002). Osmotic Tolerance Limits and Effects of Cryoprotectants on Motility of Bovine Spermatozoa. *Biol Reprod.*67, 1811-1816.
- Hafez, E. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. (5ª Edición). Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México D.F.
- Igboeli, G. & Foote, R. (1968). Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, Vol, 57, Issue 2:212-219.
- Jeyendran, R., Van der Venn, H. y Zaneveled, L. (1992). The hipo-osmotic swelling test: an update. *Ach.Androl.*29:105-116.
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J., Rouissi, H., Herraiez, P. y Anel, L. (2003). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60 (2003) 1249-1259.
- Kishikawa, H., Tateno, H. & Yanagimachi, R. 1999). Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *J Reprod Fertil* 116:217-22.
- König, H. y Liebich, H. (2010). *Anatomía de los Animales Domésticos*; texto y atlas en color, segunda edición corregida y ampliada. (Tomo 2). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Lambrechts, H., Van Nieverk, F., Coetzer, W., Cloete, S., Vander, H. (1999). The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syn ceruscaffer*) spermatozoa. *Theriogenology* 52, 1241-1249.



- Leibfried, L. & First, N. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48: 76-86.
- Martins, C., Rumpf, R., Pereira, D., Dode, M. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* 101, 326-331.
- Martins, C., Driessen, K., Melo Costa, P., Carvalho-Neto, J., De Sousa, R., Rumpf, R. & Dode, M. (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, F., Garcia, V., Alvarez M., Chamorro, C. & Herraiz, P. (2006). Comparison of Two Methods for Obtaining Spermatozoa from the Cuada Epididymis of Iberian Red Deer. *Theriogenology* 65, 471-485.
- May, E. (1968). *Manual de Disección de la Anatomía del Ovino*. Impreso en la Argentina. Editorial Hemisferio Sur. Pasteur 743-Buenos Aires-Argentina.
- Mellisho, E. (2010). *Manual de Laboratorio de Reproducción Animal*. Universidad Nacional Agraria 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.
- Neild, D., Miragaya, M., Chaves, G., Pinto, M., Alonso, A., Gamabarotta, M., Losinno, L. y Agüero, A. (2006). "Cryopreservation of Cauda Epididymis Spermatozoa from Slaughterhouse Testicles 24 h after Ground Transportation". *Animal Production Science* 94: 92-95.
- Pursel, V., Johson, L. y Rampacek, G. (1972). Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci*, vol.34, no.2:278-281
- Quispe, A. (2015). *Evaluación de la Sobrevivencia y Fertilidad In Vivo de Espermatozoides del epidídimo de toros criollos post mortem*. (Tesis de Pre Grado). UNA- Puno.
- Randall, D., Burggren, W. y French, K. (1997). *Animal physiology*. New York. W.H. Freeman and Company. p. 95.
- Reyes-Moreno C., Boilard, M., Sullivan, R. y Sirar, M. (2002). Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol. Reprod.* 66, 159-166.

- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanasawa, M., Mello-Martins, M. y Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch Med. Vet. Vol 46* n° 1:31-38.
- Robledo, J., Herrera, J., Cajero, M., Navarro, M.C. y García, A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 10, núm. 1, 2009, pp. 95-99. Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, Yucatán, México. Disp. En: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243009>
- Rodríguez, F. (2012). *Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor masculino*. Disponible en: [www.es.slideshare.net/pipe69/anatomía-y-fisiología](http://www.es.slideshare.net/pipe69/anatomía-y-fisiología) (acceso: 15-01-2016).
- Salomon, S. y Maxwell, W. (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). Universidad de la Frontera. Temuco, Chile.
- Salisbury, G., Van Dermack, L. y Lodge, J. (1982). *Fisiología de la Reproducción e inseminación Artificial de los Bóvidos*, (traducido por José María Torzona Vilas, Segunda Edición). Zaragoza, España: Acribia.
- Shakeri, M., Roshanfekar, H., Mamoei, M. and Mirzadeh, K. (2008). Effecto of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 3 (6): 400-408.
- Soberano, A., Bravo, A., Olivo, I., Toscano, I., Cajero, M., Herrera, J., Navarro, M. y Segura, J. (2011). Fertilización de ovocitos caprinos madurados en dos medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 14, núm. 1, enero-abril, 2011, pp. 301-307 Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, Yucatán, México. Disp. en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93915703029>
- Soler, A., Estes, M., Fernández-Santos, M. y Garde, J. (2005). Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymes for several days. *Theriogenology*. 64:1503-1517.
- Soler, A., García, A., Fernández-Santos, M., Estes, M. y Garde, J. (2003). Effects of Thawing Procedure on Postthawed *In Vitro* Viability and *In Vivo* Fertility of Red

- Deer Epididymal Spermatozoa Cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J Androl.* 2003; 24:746-756.
- Songsasen, N., Tong, J. & Leibo, P. (1998). Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to 24 h after death. *J. Exp. Zool.* 280, 189-196.
- Sostaric, E., Alberts, M., Gadella, B. & Stout, T. (2008). The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 237-248.
- Vásquez, M., Martínez, A., Roca, J., Blanco, O., Lucas, X. & Matas, C. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology* 47:913-922.
- Watson, P. (1992). Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. *J. Reprod. Fertil.* 7:871-891.
- 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.
- Yanagimachi, R. (1981). *Mechanisms of fertilization in mammals*. En fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, New York. 81-182.
- Yu, I. & Leibo, S. (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymes stored for 8 days at  $4^{\circ}\text{C}$ . *Theriogenology* 57:1179-90.



**Anexo 1.** Análisis de variancia para la motilidad masal antes de la congelación y después de la descongelación

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Manejo	1	144.2976611	144.2976611	5.06 *
Edad	1	32.6768479	32.6768479	1.14 NS
Técnica	1	2.7087755	2.7087755	0.09 NS
Error	28	799.2116201	28.5432721	
<b>Total correcto</b>	<b>31</b>	<b>978.8949046</b>		

**Anexo 2.** Prueba de Tukey para la motilidad masal antes de la congelación y después de la descongelación

Alfa	0.05		
Error de grados de libertad	28		
Error de cuadrado medio	28.54327		
Valor crítico del rango estandarizado	2.8969		
Diferencia significativa mínima	3.8692		
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes			
	Media	N	Manejo
	A 49.279	16	ANTES
	B 45.032	16	DESPUES

**Anexo 3.** Análisis de variancia para motilidad individual antes de la congelación y después de la descongelación

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Manejo	1	132.6866499	132.6866499	5.04 *
Edad	1	73.5808708	73.5808708	2.80 NS
Técnica	1	23.6870290	23.6870290	0.90 NS
Error	28	736.6963185	26.3105828	
<b>Total correcto</b>	<b>31</b>	<b>966.6508681</b>		

**Anexo 4.** Prueba de Tukey para la motilidad individual antes de la congelación y después de la descongelación.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	28
Error de cuadrado medio	26.31058
Valor crítico del rango estandarizado	2.8969
Diferencia significativa mínima	3.7148
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes	
	Media      N      Manejo
A	47.837      16      ANTES
B	43.764      16      DESPUES

**Anexo 5.** Análisis de variancia para test hipo-osmótico (host) antes de la congelación y después de la descongelación

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Manejo	1	26.19845596	26.19845596	4.98 *
Edad	1	92.03997221	92.03997221	17.49 **
Técnica	1	30.50223969	30.50223969	5.8 *
Error	28	147.3083803	5.2610136	
<b>Total correcto</b>	31	296.0490481		

**Anexo 6.** Prueba de Tukey para el manejo en el test hipo-osmótico (host) antes de la congelación y después de la descongelación

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	28
Error de cuadrado medio	5.261014
Valor crítico del rango estandarizado	2.8969
Diferencia significativa mínima	1.6611
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes	
	Media      N      Manejo
A	43.0565      16      ANTES
B	41.2469      16      DESPUES

**Anexo 7.** Prueba de Tukey para la edad en el test hipo-osmótico (host) antes de la congelación y después de la descongelación

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	28
Error de cuadrado medio	5.261014
Valor crítico del rango estandarizado	2.89690
Diferencia significativa mínima	1.6611

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

	Media	N	Edad
A	43.8477	16	BLL
B	40.4558	16	D4

**Anexo 8.** Prueba de Tukey de técnica para el test hipo-osmótico (host) antes de la congelación y después de la descongelación

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	28
Error de cuadrado medio	5.261014
Valor crítico del rango estandarizado	2.89690
Diferencia significativa mínima	1.6611

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

	Media	N	Técnica
A	43.1280	16	T2
B	41.1754	16	T1

**Anexo 9.** Análisis de variancia para la vitalidad antes de la congelación y después de la descongelación

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Manejo	1	8.22682418	8.22682418	0.39 NS
Edad	1	23.77565043	23.77565043	1.12 NS
Técnica	1	63.53383770	63.53383770	3.00 NS
Error	28	592.0670865	21.1452531	
<b>Total correcto</b>	31	687.6033988		

**Anexo 10.** Análisis de variancia para la anormalidad de espermatozoides antes de la congelación y después de la descongelación

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Manejo	1	0.00347837	0.00347837	0.05 NS
Edad	1	0.07112073	0.07112073	1.03 NS
Técnica	1	0.21415612	0.21415612	3.09 NS
Error	28	1.93872219	0.06924008	
<b>Total correcto</b>	31	2.22747741		

**Anexo 11.** Análisis de variancia para la integridad de acrosoma de espermatozoides antes de la congelación y después de la descongelación

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Manejo	1	22.44129677	22.44129677	3.44 NS
Edad	1	40.70374343	40.70374343	6.24 *
Técnica	1	0.04277554	0.04277554	0.01 NS
Error	28	182.5779692	6.5206418	
<b>Total correcto</b>	31	245.7657850		



**Anexo 12.** Prueba de Tukey para la edad en la integridad de acrosoma de espermatozoides antes de la congelación y después de la descongelación

Alfa			0.05
Error de grados de libertad			28
Error de cuadrado medio			6.520642
Valor crítico del rango estandarizado			2.89690
Diferencia significativa mínima			1.8493
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes			
	Media	N	Edad
A	55.6937	16	BLL
B	53.4380	16	D4

**Anexo 13.** Análisis de variancia para óvulos fertilizados

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor
Edad	1	0.00448730	0.00448730	0.21 NS
Técnica	1	0.00448730	0.00448730	0.21 NS
Error	13	0.27372518	0.2105578	
<b>Total correcto</b>	15	0.28269978		

**Anexo 14.** Análisis de variancia para embriones en fase de mórula

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado de la	F-Valor
Edad	1	0.00448730	0.00448730	0.21 NS
Técnica	1	0.00448730	0.00448730	0.21 NS
Error	13	0.27372518	0.2105578	
<b>Total correcto</b>	15	0.28269978		

**Anexo 15.** Fórmula de preparación del dilutor tris-yema de huevo y glicerol,

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

Fuente: Harshan *et al.* (2006)

**Anexo 16.** Preparación de soluciones stocks y medios de cultivo de trabajo colección y lavado de los coc talp-hepes solución de trabajo

	/mL		
TALP HEPES (stock)	-----	100 mL	200 mL
BSA Fracción V	3 mg	1000 µL	2000 µL
DL-Lactato de Sodio (60 % Na)	1.87 µL	187 µL	373 µL
Gentamicina (stock)	1.0 µL	100 µL	200 µL

Determine: pH y ajuste a 7.3-7.4

Filtre: con filtros 0.22 µm

Guarde: a 28 – 30 ° C, en botellas estériles y siempre prepárelo fresco el día de su uso

**Anexo 17.** Fert-talp solución de trabajo

Cantidad/mL				
FERT-TALP (stock)		-----	2.5 mL	5 mL
BSA Fracción V		6 mg /mL	15 mg	30 mg
Piruvato de sodio (stock)		10 µL/mL	25 µL	50 µL
Gentamicina (stock)		1.0 µL/mL	2 µL	5 µL

Filtre: con filtros de 0.22 µm

Prepare: las Gotas y cubra con aceite mineral

Guarde: inmediatamente en el incubador.

**Anexo 18.** Sperm-talp solución de trabajo

Cantidad/mL		
SPERM-TALP (stock)	-----	50 mL
BSA Fracción V	6 mg/mL	300 mg
Piruvato de Sodio (stock)	10 µL/mL	500 µL
Gentamicina (stock)	1.0 µL/mL	50 µL

Filtre: con filtros de 0.22 µm

**Anexo 19.** Preparación de las gotas de maduración (IVM)

- Se preparó gotas de 50  $\mu$ L de medio de maduración (TCM-199 Earle's salts + suero fetal + piruvato + FSH, LH, Estradiol 17B) en una placa Petri (60 x 10 Falcon 1007).
- Se cubrió con 10 mL de aceite mineral, previamente equilibrado (para tal efecto se mantuvo el aceite en el incubador diariamente con la tapa suelta)
- Se colocaron las placas de maduración en el incubador al menos por 2 horas antes de colocar los COC para que se equilibre (temperatura y atmosfera de gases)
- Colocamos los COC previamente lavados (TAL-HEPES solución de trabajo) y seleccionados (ovoplasma y cumulus) y se volvió la placa al incubador lo más rápido posible.
- Se cultivaron los COC por 22-24 horas en estas condiciones. No se abrieron las puertas del incubador.
- Después de este tiempo se juntaron todos los COC, en una placa con TALP- HEPES y se desnudaron de su granulosa, y se pasó varias veces por un pipeta Pasteur previamente preparada (lumen angosto) y se agitaron en el Vortex por 3 minutos.
- Se recuperaron los ovocitos y lavados 3 veces con TALP-HEPES antes de ser colocados en las gotas de fecundación, para eliminar residuos de glucosa que afectan el efecto de la heparina.

**Anexo 20.** Preparación de gotas de fecundación (IVF)

- Se preparó gotas de 44  $\mu\text{L}$  de medio de fecundación (FERT TALP) en una placa Petri (60 x 10 Falcon 1007)
- Se cubrieron con 10 mL de aceite mineral, previamente equilibrado (Para tal efecto se mantuvo el aceite en el incubador durante todo el tiempo con la tapa suelta).
- Se colocaron las placas en el incubador al menos por 2 horas antes de colocar los COC para que se equilibre (temperatura y atmósfera de gases).
- Se colocaron los ovocitos previamente lavados y desnudos sin su cumulus (TALP-HEPES solución de trabajo) y en un número de 10 por gota y se volvió la placa rápidamente al incubador.
- Se colocaron dentro de la gota 2  $\mu\text{L}$  de (Penicilina/Hipotaurina/Epinefrina, PHE), 2  $\mu\text{L}$  de heparina (en la concentración adecuada generalmente 2 a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- Se co-cultivó los ovocitos /espermatozoides por 8 a 18 horas en estas condiciones no se abrió la puerta si no fuera necesario.
- Se recuperaron los ovocitos y se colocaron en TALP-HEPES y se agitaron en el Vortex por 1-3 segundos.
- Se lavaron los cigotos 3 veces con TALP-HEPES antes de colocarlos en las gotas de cultivo.

**Anexo 21.** Preparación de gotas de desarrollo (IVC)

- Se hicieron gotas de 100  $\mu$ L en una placa Petri (60 x 10 Falcon 1007) usando medio de desarrollo condicionado y TCM-199 Earle`s salts con 10 % suero fetal en una proporción de 1:1.
- Se mantuvo el TCM en el incubador al menos 2 horas antes de preparar el cultivo para que se equilibre (temperatura y mezcla de gas).
- Se cubrió con 10 mL de aceite mineral, previamente equilibrado (Para tal efecto se mantuvo el aceite en el incubador diariamente con la tapa suelta).
- Se agregó 0,8 a 1  $\mu$ L de la suspensión BOEC por gota y donde se puede transferir los cigotos.
- Se volvió rápidamente la placa al incubador y no se abrió la puerta si no fuera estrictamente necesario.
- Se determinó el desarrollo embrionario y se agregó cada 48 horas el medio TCM, medio condicionado previamente preparado y guardado en la incubadora durante el tiempo que duró el cultivo.