



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL.

**“Efecto de dos temperaturas de almacenamientos
(5 y 20 °C) de epidídimos provenientes de toros de
matadero sobre la calidad y congelabilidad de
espermatozoides”**

*Tesis de grado previo a la
obtención del título de Magister en
Reproducción Animal.*

AUTOR: MVZ. Edwin Enrique Valverde Peralta.

DIRECTOR: MVZ. Diego Andrés Galarza Lucero. Mg .Sc.

CO-DIRECTOR: Dr. Ricardo Horacio Alberio. PhD.

CUENCA - ECUADOR
2016



RESUMEN

En esta investigación se evaluó la calidad espermática post-descongelación de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros de matadero sometidos a dos temperaturas de almacenamiento (5°C y 20°C). Se colectó 8 pares de testículos se almacenó herméticamente en bolsas plásticas con Lactato Ringer por 6 horas. Los gametos fueron recuperados por flujo retrógrado de la cola del epidídimo se evaluó concentración, viabilidad espermática, se procesó ajustando a dosis de 50×10^6 esp/0,25ml con el diluyente AndroMed al 20%. Se empajueló, se crioconservó en nitrógeno líquido. A los 7 días se evaluó calidad post-descongelación con un método convencional y con un sistema computarizado (CASA) *Sperm Vision Production- versión 1.01* (Minitube). Los datos fueron analizados en el programa SPSS (versión 22) obteniendo mejores resultados a 5°C un $84,2 \pm 1,54\%$ en espermatozoides recuperados, existiendo diferencias ($p < 0,05$) según el ADEVA. En calidad post-descongelación también mostró mejores resultados de MIP, Vitalidad espermática (VE) con 5°C, un $33,4 \pm 2,42$ y $60,3 \pm 2,61\%$ respectivamente, con diferencias significativas ($p < 0,05$) pero con el sistema CASA al evaluar MIP no existió diferencias ($p > 0,05$), sin embargo, en anomalías morfológicas los dos grupos fueron iguales ($p > 0,05$); y en la prueba de endósmosis de la membrana (HOST) se obtuvo mejores resultados con 20°C con $40,4 \pm 3,26$ ($p < 0,05$). Corroboramos esta relación estadística con un análisis multivariante (MANOVA) agrupando variables y analizando en los grupos en estudio ($p < 0,05$). En conclusión, la calidad post- descongelación fue distinta en los dos grupos pero a 20°C de almacenamiento se obtuvo resultados inferiores de calidad espermática post-descongelación rechazando lo planteado, a excepción de la pruebas de HOST.

PALABRAS CLAVES.

EPIDÍDIMO, RETRÓGRADO, ESPERMATOZOIDEOS, CRIOCONSERVACIÓN, COMPUTER ASSISTED SEMEN ANÁLISIS (CASA).



ABSTRACT

In this research we evaluated the sperm quality post-thawing of sperm of the cauda epididymis of bulls of slaughterhouse subject to two temperatures of storage (5°C and 20°C). 8 pairs of testicles was collected stored tightly in plastic bags with Lactate Ringer for 6 hours. The gametes were recovered by retrograde flow of the cauda epididymis sperm concentration, viability was assessed and processed by adjusting doses of 50×10^6 sperm / 0.25ml with the diluent AndroMed to 20%. It packing, cryopreserved in liquid nitrogen. At 7 days assessed quality post-thawing with a conventional method and with a computerized system (CASA) *Sperm Vision Production- versión 1.01* (Minitube). The data were analyzed in the SPSS program (version 22) obtaining best results to 5°C a $84,2 \pm 1,54$ % in recovered sperm, there are significant differences ($p < 0,05$) according to the ADEVA. In quality post-thawing also showed better results of MIP, vitality sperm (VE) with 5°C, $33,4 \pm 2,42$ and $60,3 \pm 2,61$ %, respectively, with significant differences ($p < 0,05$) but with the CASA system to evaluate IPM there was no differences ($p < 0,05$), however, morphologic abnormalities the two groups were similar ($p < 0,05$); and in the test of endosmosis of the membrane (HOST) was obtained best results with 20° C with $40,4 \pm 3,26$ ($p < 0,05$). We corroborate this statistical relationship with a multivariate analysis (MANOVA) by grouping variables and analyzing in the study groups ($p > 0,05$). In conclusion, quality post-thawing was different in the two groups but at 20°C storage was obtained results lower sperm quality post-thawing rejecting the issues raised, except for of the evidence of HOST.

KEYWORDS.

EPIDIDYMIS, RETROGRADE, SPERM CRYOPRESERVATION, COMPUTER ASSISTED SEMEN ANALYSIS (CASA).



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
TABLA DE CONTENIDOS	3
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ANEXOS.....	9
CLAUSULA DE DERECHOS DE AUTOR.....	10
CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	11
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL.....	11
AGRADECIMIENTOS	13
DEDICATORIA.....	14
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA.....	15
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	17
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
2.1.- TESTÍCULOS Y ESPERMIOGÉNESIS.....	19
2.1.1.- El epidídimo y los espermatozoides del toro	19
2.1.2.- Función del epidídimo	21
2.1.3.-Transporte de los espermatozoides en el epidídimo	21
2.1.4.-Maduración de los espermatozoides en el epidídimo.....	22
2.1.5.-Producción de plasma en el epidídimo.....	22
2.1.6.-Almacenamiento y maduración de espermatozoides en la cola del epidídimo.....	22



2.2.- ESPERMATOZOIDES	23
2.2.1.- Morfología Microscópica.....	24
2.2.2.- Morfología anormal	26
2.2.3.- Membrana espermática.....	27
2.3.- PLASMA SEMINAL	28
2.4- PRUEBAS DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA	29
2.4.1.- Concentración espermática.....	29
2.4.2.-Motilidad individual progresiva	30
2.4.3.- Vitalidad espermática	30
2.4.4.- Anormalidades	31
2.4.5.- Test de endósmosis (HOST)	31
2.4.6.- Computer Assisted Semen Analysis (CASA)	32
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1.- Materiales.....	36
3.1.1.- Recursos biológicos	36
3.1.2.- Materiales de laboratorio.....	36
3.1.3.- Reactivos.....	36
3.2.- Caracterización de la unidad de análisis.....	37
3.3.- Lugar de la investigación.....	37
3.4.- Metodología de trabajo.....	38
3.4.1.- Recolección de testículos de camal	38
3.4.2.- Recuperación de espermatozoides del epidídimo por flujo retrógrado.....	39
3.4.3.- Evaluación de viabilidad espermática	40
3.4.3.1.- Concentración espermática.....	40



3.4.3.2.- Motilidad individual progresiva (MIP).....40

3.4.4.- Procesamiento del contenido epididimario41

3.4.4.1.- Ajuste de dosis inseminate.....41

3.4.4.1.1.- Como se determinó el N° de pajuelas del espermatozoides recolectado41

3.4.4.1.2.- Como se determinó la cantidad de diluyente necesario41

3.4.4.2.- Preparación del diluyente42

3.4.5.- Dilución.....42

3.4.6.- Preparación de pajuelas y rejillas42

3.4.7.- Empajuelado43

3.4.8.- Crioconservación.....43

3.4.9.- Descongelamiento.....43

3.4.10.- Evaluación post-descongelado.....43

3.4.10.1.- Motilidad Individual progresiva (MIP) espermática43

3.4.10.1.1.- Método convencional-MIP44

3.4.10.1.2.- Computer Assisted Semen Analysis (CASA)-MIP44

3.4.10.2.- Vitalidad espermática45

3.4.10.3.- Anormalidades espermáticas45

3.4.10.3.1.- Método convencional-anormalidades espermáticas.....45

3.4.10.3.2.- Computer Assisted Semen Analysis (CASA)-anormalidades espermáticas46

3.4.10.4.- Prueba de endosmosis de la membrana (HOST).....46

3.5.- Diseño estadístico47

CAPITULO IV: RESULTADOS48

4.1.- Motilidad espermática individual progresiva de espermatozoides epididimarios recuperados48



4.2.- Viabilidad espermática post-descongelados	49
4.3.- Datos de Motilidad según el sistema CASA	50
CAPITULO V: DISCUSIÓN	52
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
6.1.- CONCLUSIONES.....	57
6.2.- RECOMENDACIONES	58
7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	67



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores porcentuales promedios y significación del MIP pre-congelación de espermatozoides epididimarios provenientes de dos temperaturas 48

Tabla 2. Valores porcentuales promedios y significación de MIP, VE, Anormalidades morfológicas y pruebas de HOST post-descongelación realizado a espermatozoides epididimarios provenientes de dos temperaturas..... 49

Tabla 3. Valores promedios y error estándar de Motilidad y Anormalidades realizados a espermatozoides epididimarios descongelados en los dos grupos en estudio con el sistema CASA..... 51



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Testículo y epidídimo en el toro (De Pauw, 2003).....	19
Figura 2. Estructuras del espermatozoide (Garner y Hafez, 1996).....	26
Figura 3. Vitalidad espermática (González et al., 2013).	31
Figura 4. Representación esquemática de espermatozoides reaccionados positivamente al test (Rubio, et al., 2006 A).	32
Figura 5. Programa “CASA” con PC. Fuente: (minitube internacional).....	33
Figura 6. Camal Municipal del cantón Santiago. Fuente: Google Earth.	37
Figura 7. Granja Experimental IRQUIS - Universidad de Cuenca. Fuente: Google Earth.	38



LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. ADEVA de la variable MIP para espermatozoides recuperados.	68
Anexo 2. ADEVA para Variables de viabilidad espermática pos-descongelación. ...	69
Anexo 3. MANOVA de la viabilidad espermática pos-descongelación y según los dos grupos de temperatura en estudio.	70
Anexo 4. ADEVA para Variables de viabilidad espermática pos-descongelación según el sistema CASA.	71
Anexo 5. Fotografías de los materiales y de los trabajos de campo.....	72
Anexo 6. Fotografías de trabajos realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la Granja Irquis de la Universidad de Cuenca.	74
Anexo 7. Fotografías de Motilidad espermática individual progresiva con el método convencional.....	77
Anexo 8. Fotografías de Vitalidad espermática con el método convencional.....	78
Anexo 9. Fotografías de Anomalías espermáticas con el método convencional.	78
Anexo 10. Fotografías del Test de “HOST”.	78
Anexo 11. Fotografías del equipo del sistema “CASA” y de su evaluación.	79



CLAUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

Edwin Enrique Valverde Peralta, autor de la tesis **“EFECTO DE DOS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTOS (5 Y 20°C) DE EPIDÍDIMOS PROVENIENTES DE TOROS DE MATADERO SOBRE LA CALIDAD Y CONGELABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca. en base al Art 5 literal c) de su reglamento de propiedad intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **MAGÍSTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 15 abril del 2016.

Atentamente:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Edwin Valverde Peralta".

Edwin Enrique Valverde Peralta.
1400481972



CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Edwin Enrique Valverde Peralta, autor de la tesis con el título: ***“EFECTO DE DOS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTOS (5 Y 20°C) DE EPIDÍDIMOS PROVENIENTES DE TOROS DE MATADERO SOBRE LA CALIDAD Y CONGELABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES”***, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 15 abril del 2016.

Atentamente:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Edwin Valverde Peralta".

Edwin Enrique Valverde Peralta.
1400481972



CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL

El Tribunal de Tesis de Grado **CERTIFICA:** Que fue aprobado el presente trabajo de investigación titulado Título: **“EFECTO DE DOS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTOS (5 Y 20 °C) DE EPIDÍDIMOS PROVENIENTES DE TOROS DE MATADERO SOBRE LA CALIDAD Y CONGELABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES”**, realizado por el Sr. Edwin Enrique Valverde Peralta. Médico Veterinario Zootecnista.

Cuenca, 15 abril del 2016.

 Dr. Manuel Soria Parra. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Dr. Ulises Iñiguez Gutiérrez. MIEMBRO DEL TRIBUNAL
---	---



AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a Dios por guiar mis pasos y regalarme lo más grande que tengo en la vida, mi familia y darme la oportunidad de superarme.

A mis padres, hermanos, abuelitos, tíos, primos y amigos que de una y otra forma me apoyaron y confiaron en mí en el transcurso de mis estudios para culminar mi más cercana meta de mi vida.

Al MVZ. Diego Andrés Galarza L. y al Dr. Ricardo Alberio PhD. por haber colaborado con su valioso tiempo y sabiduría en la tutoría de esta tesis.

A los docentes de la MAESTRÍA DE REPRODUCCIÓN ANIMAL de la Universidad de Cuenca por los conocimientos inculcados en esta etapa de mi vida, en donde he ido recogiendo valiosos conocimientos.

Edwin Enrique Valverde Peralta.



DEDICATORIA

Este trabajo dedico de todo corazón a mis padres Tarquino y Nancy que a pesar de las adversidades de la vida siempre estuvieron apoyándome, para que me superara cada día, por darme su apoyo cuando más lo necesite.

A mis hermanos Marcela, Carina, Doris, Diego que sin dudar me supieron dar su apoyo.

A mi esposa Vilma Cáceres por ser siempre un apoyo constante en mi vida personal y profesional.

“A mi hijo bello recién nacido Daniel Enrique, y que estoy muy feliz de tenerlo a nuestro lado, él es y será siempre la motivación que hará que salgamos adelante y pensar siempre en ser mejores que ayer.”

Edwin Enrique Valverde Peralta.



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

°C	Grado Celsius
cm	Centímetro
IA	Inseminación artificial
ATP	Adenosín trifosfato
pH	Potencial hidrógeno
núm.	Número
ml	Mililitro
cAMP	Cíclico Adenosín Monofosfato
ME	Membrana espermática
kDa	Kilo dalton
FHS	Hormona folículo-estimulante
LH	Hormona luteinizante
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
HOST	Hypoosmotic swelling test (prueba hipoosmótica)
mOsm/L	Miliosmoles por litro.
VAP:	Es la distancia recorrida por espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.
VSL:	Velocidad según la trayectoria rectilínea.
VCL:	Velocidad según la trayectoria curvilínea.



ALH:	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide
BCF:	Frecuencia de corte de la línea de trayectoria.
LIN:	Linealidad.
STR:	Rectilineidad.
WOB:	Índice de oscilación.
MOT:	Porcentaje de espermatozoides motiles
PRG:	Porcentaje de espermatozoides motiles progresivos.
Kg	kilogramo.
MAGAP	Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.
MIP	Motilidad Individual Progresiva
μl	Microlitros.
FR	Flujo retrógrado.
Cc	Centímetro cubico.
VE	Vitalidad Espermática
DCA	Diseño Completamente al Azar
ADEVA	Análisis de varianza
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences (programa estadístico de las ciencias sociales)</i>
TEMP	Temperatura



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La crioconservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación de germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la Inseminación Artificial (IA), representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad (Ribeiro-Peres et al., 2014). La crioconservación proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo, Rodríguez, and Rodriguez, 2008). Las pérdidas inesperadas de animales de alto valor genético, así como la dificultad para obtener muestras de semen de especies silvestres conducen a un aumento en el uso de técnicas de reproducción artificial, ya que resulta ser una de las posibilidades únicas a preservar el material genético de estos animales (Kaabi et al., 2003).

La recuperación y criopreservación de espermatozoides de la cola de epidídimos de animales muertos (recuperación postmortem) es una opción viable en el mantenimiento de su germoplasma disponible para su futuro uso (Turri et al., 2012). Los estudios han demostrado la eficacia y el potencial de los espermatozoides del epidídimo para dar lugar a la fertilización in vitro y in vivo mediante el uso de estos espermatozoides en la IA, fecundación in vitro e inyección intracitoplasmática de esperma con resultados satisfactorios (Martins et al., 2007) (Monteiro et al., 2011).

En los toros, el método más apropiado para la recuperación de espermatozoides del epidídimo es por el método o técnica del flujo retrógrado. Este método proporciona muestras de esperma de buena calidad libres de las células y los contaminantes del tejido sanguíneo (Turri et al., 2012). La cola del epidídimo en los mamíferos es responsable del almacenamiento de espermatozoides viables hasta el momento de la eyaculación y proporciona un medio favorable para la preservación de su capacidad de fertilización durante varias semanas (Jones, 2004). Sin embargo, se sabe que después de la muerte del animal, los gametos en el cuerpo de los animales, no tiene una degeneración rápida, y las condiciones tales como el tiempo y la temperatura a la que el epidídimo está expuesta influyen directamente en la



viabilidad de los espermatozoides (Kaabi et al., 2003). Lo óptimo sería hacer la colección de los gametos inmediatamente después de la muerte del animal; sin embargo, esto generalmente no siempre es posible. En los países de diferentes regiones climáticas, la recolección y la conservación de los espermatozoides del epidídimo inmediatamente post-mortem demuestra ser difícil debido a la temperatura ambiente (trópico o sierra), falta de técnicos, o equipos para su procesamiento (Martins et al., 2007). En países tropicales, los animales están expuestos a una temperatura promedio de 20 °C. Los estudios realizados en diversas especies han evaluado la durabilidad de espermatozoides en la cola del epidídimos mantenidas a temperatura ambiente de aproximadamente 20 °C (Weiss et al., 2008). En la especie bovina, hay pocos informes de la recuperación de los gametos masculinos en estas condiciones ambientales. Otros estudios en varias especies han demostrado que cuando se mantienen los epidídimos en frío inmediatamente después de la muerte, la viabilidad de espermatozoides se mantiene durante períodos largos (Martins et al., 2009). No obstante, en el Ecuador, el sistema de producción extensivo de ganado bovino en el trópico (Amazonía Ecuatoriana) se ha ido extendiendo, al haber encontrado el cadáver de un animal de alto valor genético, y se quiere recuperar pero no se cuenta con todos los materiales ni las condiciones necesarias para realizar un trabajo de conservación y transporte de células hasta llegar a un centro de procesamiento. (Grijalva et al., 2004).

Para este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general: Evaluar la calidad espermática post-descongelación de espermatozoides epididimarios de testículos de toros provenientes de matadero y almacenados a dos temperaturas (5°C y 20°C).

El objetivo específico fue: Comparar el efecto de dos temperaturas de conservación de testículos post-mortem (5 y 20°C) sobre la congelabilidad de espermatozoides epididimarios por el método convencional y sistema computarizado CASA.

Como hipótesis se ha planteado “Que las temperaturas altas (20 °C) de mantenimiento del testículo post-mortem (6 horas), muestran iguales o mejores resultados en la calidad espermática post-descongelación de espermatozoides epididimarios y al test de HOST; que los testículos mantenidos a bajas temperaturas (5 °C)”.

CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- TESTÍCULOS Y ESPERMIOGÉNESIS

Los espermatozoides se producen en los testículos, fuera de la cavidad abdominal en una bolsa de piel llamada escroto. El escroto protege el testículo en contra de ambos extremos de la temperatura (Setchell, B.P., 1998). Cada testículo está constituido de túbulos seminíferos contienen espermatogonias, que son responsables de la producción y la diferenciación de los espermatoцитos en espermátidas y finalmente en espermatozoides. Este proceso tarda varios días y se llama espermatogénesis. Después de esta formación, los espermatozoides son transportados en los túbulos más grandes para formar la red testicular en el centro del testículo. Los conductos eferentes son 12 que emergen de la red testicular y entran en el epidídimo (De Pauw, 2003).

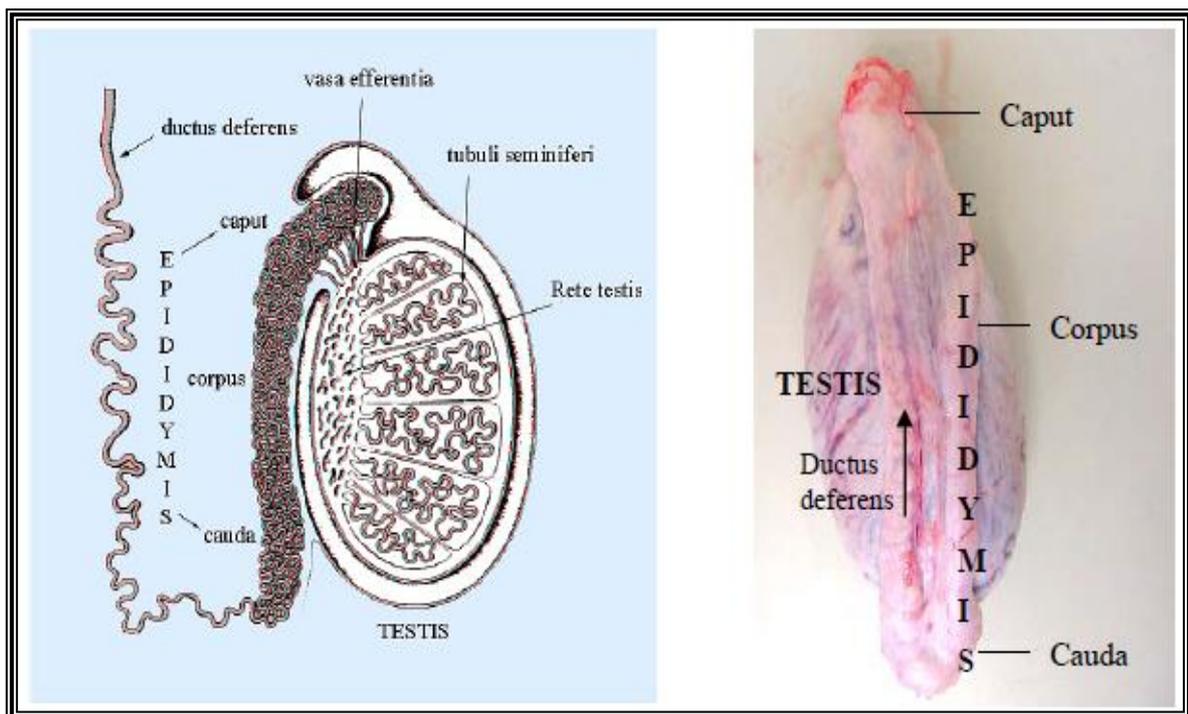


Figura 1. Testículo y epidídimo en el toro (De Pauw, 2003).

2.1.1.- El epidídimo y los espermatozoides del toro

En el bovino el epidídimo puede cubrir una longitud total de 40 metros (Hoskins et al., 1978) (De Pauw, 2003). Y consta de un largo conducto, altamente retorcido, la



conexión de los conductos eferentes a conductos deferentes (Cavalcante et al., 2012). Morfológicamente, el epidídimo se divide anatómicamente en tres partes principales: caput (cabeza), corpus (cuerpo) y cauda (cola) (De Pauw, 2003) (Oliva et al., 2009).

La cabeza es la parte más voluminosa, recorre el polo dorsal del testículo y desciende unos 25-30 mm de la superficie dorso lateral del testículo.

El cuerpo del epidídimo se dirige hacia el polo distal del testículo como una banda de 1 cm de ancho y se une íntimamente a la cara caudo-medial del testículo.

La cola del epidídimo tiene forma cónica y se une estrechamente por su base mayor al polo distal del testículo. (Zemjanis, 1994) (Barrios, 2002).

El conducto deferente es un tubo muscular que impulsa los espermatozoides de la cola del epidídimo a la uretra en el momento de la eyaculación. Las glándulas accesorias genitales (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales) se encuentran en la región donde el conducto deferente izquierdo y derecho se unen en la uretra (König et al., 2008) Estas glándulas producen secreciones que componen la mayor parte de la porción líquida del semen de toro. En la eyaculación, la abertura entre la vejiga y el comienzo de la uretra se cierra al mismo tiempo y la secreción de las glándulas accesorias y los espermatozoides se mezclan, se introduce a la uretra para ser forzado a salir de la abertura externa en el ápice del pene. El volumen de semen y el número de espermatozoides eyaculados por diferentes toros varía considerablemente. Sin embargo, la mayoría de los toros eyaculan 3 a 5 ml de semen que contiene 1 billón de espermatozoides por ml, o 3-5 billones de espermatozoides por eyaculado (De Pauw, 2003). Características específicas de los espermatozoides les confieren la particularidad de ser una "Célula germinal". El espermatozoide es una célula haploide, casi desprovisto de citoplasma y otros orgánulos celulares, excepto por el núcleo, el acrosoma, y una serie de mitocondrias en una disposición de extremo a extremo helicoidal situado en la región anterior del flagelo (Barker, 1954). En el núcleo, los cromosomas son altamente condensados y por lo tanto impiden cualquier actividad transcripcional para reemplazar proteínas. El acrosoma permite al espermatozoide interactuar y penetrar en el ovocito en la fecundación. Las mitocondrias proporcionan ATP, que se utiliza sobre todo para



mantener la motilidad. Los espermatozoides carecen del transporte intracelular y sistemas de almacenamiento del aparato de Golgi y retículo endoplásmico. Para mantener funcional las membranas celulares y para someterse a cambios de maduración que confieren a la motilidad de los espermatozoides y capacidad de fertilizar, el espermatozoide se basa en la absorción de moléculas de los alrededores de su medio ambiente (Amann & Griel, 1974).

2.1.2.- Función del epidídimo

En los mamíferos, el epidídimo tiene varias funciones, haciendo hincapié en la absorción de fluidos procedente de los túbulos seminíferos, promoviendo la concentración y transporte de los espermatozoides, eliminación de espermatozoides defectuosos, así como la maduración y el almacenamiento normal hasta su eyaculación. (De Pauw, 2003). La función de almacenamiento se ilustra por el hecho de que el espermatozoide sobrevive durante aproximadamente 24 horas fuera del epidídimo en un medio más diluido; mientras que se mantienen en la cola de epidídimo (in vivo) permanecen con buena viabilidad durante más de 15 días (Muradás et al., 2006).

2.1.3.- Transporte de los espermatozoides en el epidídimo

El intervalo de tiempo que los espermatozoides necesitan para pasar a lo largo de toda la longitud del conducto epididimario varía según la especie, la frecuencia de la eyaculación y algunas otras condiciones. El tiempo medio de tránsito de los espermatozoides a través de caput y corpus del epidídimo es más coherente entre la mayoría de los machos de una especie y no está influenciada por la frecuencia de la eyaculación (Amann & Griel 1974).

Los espermatozoides son transportados a través de la cola del epidídimo entre 3-13 días en la mayoría de las especies. Este tiempo depende de la longitud del epidídimo y la capacidad de almacenamiento de la cauda, este plazo podrá reducirse mediante el aumento de la frecuencia de recogida de espermatozoides, pero con el riesgo de agotar la reserva de espermatozoides en la cola del epidídimo (De Pauw, 2003).



2.1.4.-Maduración de los espermatozoides en el epidídimo

Los espermatozoides de mamíferos cuando dejan el testículo no tienen la capacidad de reconocer e intimar a los ovocitos (Moore & Akhondi, 1996) (De Pauw, 2003). Para adquirir estas habilidades, tienen que someterse a numerosas modificaciones durante el tránsito del epidídimo. Estos incluyen: alteraciones morfológicas (migración de la gota citoplasmática de abajo de la cola), estabilización de la cromatina nuclear por enlaces de sulfuro, cambios en la composición de membranas, el aumento de la susceptibilidad a los daños de choque frío, el desarrollo de la movilidad y adquisición de la fertilidad (Garde et al., 1998).

2.1.5.-Producción de plasma en el epidídimo

Las funciones más importantes de epitelio del epidídimo son el mantenimiento de un entorno adecuado para la maduración de la cabeza de los espermatozoides y el almacenamiento de espermatozoides fértiles en la cola. Más del 95% del plasma del epidídimo se reabsorbe en la primera parte del epidídimo, dando lugar a un fuerte aumento de espermatozoides (el volumen de espermatozoides como un porcentaje del volumen del plasma), y los cambios en la composición del fluido seminal (Crabo, 1965) (De Pauw, 2003). Entre el cuerpo y cola del epidídimo, se producen importantes cambios en la composición del plasma (Holt, 2000). De hecho, una gran proporción de moléculas pequeñas (aminoácidos, iones, azúcares y agua), grandes moléculas (proteínas y esteroides) y otros componentes del fluido testicular son transportados desde el lumen del conducto del epidídimo al intersticio (Mota & Machado da Silva, 2012). Algunos de los presentes componentes se producen por los espermatozoides en el mismo epidídimo o alcanzan el epidídimo por la sangre o dé la linfa (Castelo, Rodríguez, & Rodríguez, 2008) (Feliciano et al., 2003).

2.1.6.-Almacenamiento y maduración de espermatozoides en la cola del epidídimo

En los mamíferos, el almacenamiento de los espermatozoides se produce en la parte caudal del epidídimo mientras que en la mayoría de los reptiles los espermatozoides lo almacenan en el conducto deferente durante muchos meses (Licht, 1984) (De Pauw, 2003). En la mayoría de las especies, los espermatozoides



permanecen viables durante varias semanas. La producción de espermatozoides es casi continua, aunque para algunas especies de variaciones estacionales no puede ocurrir, en ambos casos, el número de espermatozoides en el epidídimo permanece constante. Aproximadamente el 55 - 65% del total de espermatozoides se almacenan en la cola del epidídimo, estando presente espermatozoides de diferentes edades (Amann & Griel, 1974) (Garde et al., 1998).

En la maduración incluye alteraciones morfológicas (migración de gota citoplasmática por la cola), la estabilización de la cromatina nuclear por enlaces de sulfuro, los cambios en la composición de las membranas, lo que aumenta la susceptibilidad a los daños de choque frío, el desarrollo de la motilidad y la adquisición de la fertilidad (Cooper, 1986; Bedford & Hoskins, 1990). Uno de los cambios más destacados en los espermatozoides durante la maduración del epidídimo es el desarrollo de la capacidad de los espermatozoides para moverse. Esto podría deberse a los cambios bioquímicos y físicos de la membrana plasmática del espermatozoide en combinación con un aumento de cAMP-concentración, una disminución del pH intracelular (pHi), los cambios en libres Ca^{2+} - iones y la velocidad de transporte de la glucosa en los espermatozoides (Hiipakka & Hammerstedt, 1978; Amann et al., 1993).

Los espermatozoides son funcionalmente maduros en la cola del epidídimo, pero se someten a cambios de membrana adicionales durante la eyaculación por componentes presentes en el plasma seminal. El proceso termina en el tracto reproductor femenino, en el que se convierten en espermatozoides capacitados, (De Pauw, 2003).

2.2.- ESPERMATOZOIDES

La concentración se da (número/ml.) de espermatozoides en un eyaculado es aproximadamente de 1200 millones para los toros. El número promedio de espermatozoides colectados de la cola de los epidídimos fue de $1,7 \times 10^9$, siendo el mínimo de $0,26 \times 10^9$ y el máximo de $4,2 \times 10^9$. (Ribeiro–Peres et al., 2014) (Castro et al., 2009). Los espermatozoides del epidídimo, son morfológicamente viables y



mantiene la posibilidad de recibir capacitación, conectarse a la zona pelúcida y fertilizar el ovocito (Goodrowe & Hay, 1993; Tsutsui et al., 2003) y tienen la motilidad progresiva mayor que o igual a la espermatozoides eyaculados (Tiplady et al., 2002). Algunos autores anuncian que después de la muerte del animal, el esperma permanece viable en el epidídimo hasta la posterior degeneración del tejido y esto afectara su viabilidad. (Bruemmer et al., 2002; Muradás et al., 2006). También se pronunciaron, si el epidídimo se almacena a baja temperaturas, la viabilidad de los espermatozoides pueden ser mantenido durante un tiempo más largo (Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002).

Se demostró que el número total de espermatozoides recuperado de la cola del epidídimo es mayor que la encontrada en un eyaculado. (Muradás et al., 2006).

2.2.1.- Morfología Microscópica

Los espermatozoides maduros son células alargadas, está cubierta en su totalidad por la membrana plasmática, está formada por tres componentes principales: cabeza, cuello y cola (Hafez, 1986; Mc. Donald, 1991).

La cabeza del espermatozoide es aplanada portadora del núcleo el que está constando de un acrosoma que contiene el material genético y mide 8-10 micrones de largo, 4-5 micrones de ancho y 0.5 micrones de grosor (Salisbury et al., 1978; Hafez, 1986; Mc. Donald, 1991). El acrosoma en la parte anterior tiene el cuerpo apical, y en la caudal tiene un estrechamiento que conforma el segmento ecuatorial, asociado a los procesos de envejecimiento celular (Salisbury et al., 1978). También, tiene una membrana acrosomal de doble pared, interna y externa, conectadas por puentes; dichas membranas se fusionan en su extremo caudal (Mc. Donald, 1991). El acrosoma contiene varias enzimas hidrolíticas (acrosina, hialuronidasa, esterases e hidrolasas ácidas) que participan activamente en el proceso de la fecundación (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997). Entre el núcleo espermático y el acrosoma se encuentra la sustancia perinuclear (Mc. Donald, 1991). La base del núcleo está rodeada por la vaina post-acrosómica donde hay proteínas ricas en azufre y receptores moleculares que reconocen al ovocito durante la fecundación (Salisbury et al., 1978).



El cuello de la célula espermática es una estructura corta (0.4-1.5 micrones de largo) ubicada entre la cabeza y la pieza intermedia. Tiene un centriolo rodeado de 9 fibras periféricas orientadas longitudinalmente que se continúan con las fibras exteriores de la pieza intermedia (Salisbury et al., 1978).

La cola o flagelo del espermatozoide está dividida en 3 partes bien diferenciadas: la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal (Mc. Donald, 1991) (Garner & Hafez, 1996). Con todos sus componentes mide 45-50 micrones de largo (Salisbury et al., 1978).

La pieza media o intermedia tiene 2 microtúbulos centrales y 9 dupletas periféricas que constituyen el filamento axial. Estas estructuras a su vez están rodeadas por 9 fibras exteriores orientadas longitudinalmente y conectadas a las fibras del cuello. Además, las mitocondrias dispuestas en patrón helicoidal conforman el aparato metabólico y rodean las 9 fibras exteriores (Mc. Donald, 1991). Un engrosamiento en forma de anillo señala el límite entre la pieza media y la pieza principal (Salisbury et al., 1978).

La pieza principal es la porción más larga del flagelo, la estructura del filamento axial es idéntica a la estructura de la pieza media (Mc. Donald, 1991), e igualmente está rodeado por las fibras exteriores que son la continuación de la pieza media (Hafez, 1989). Sin embargo, las fibras están sujetas a variaciones de tamaño y forma, y se van estrechando gradualmente hacia el final de la pieza principal (Salisbury et al., 1978). La vaina fibrosa periférica es otra estructura de la pieza principal y se forma mediante la fusión de 2 fibras exteriores con bandas semicirculares de proteínas estructurales (Salisbury et al., 1978).

La pieza terminal comienza donde finaliza la vaina fibrosa de la pieza principal. Contiene solamente el complejo del filamento axial, y los microtúbulos se reducen gradualmente en unidades que terminan en diferentes niveles (Salisbury et al., 1978).

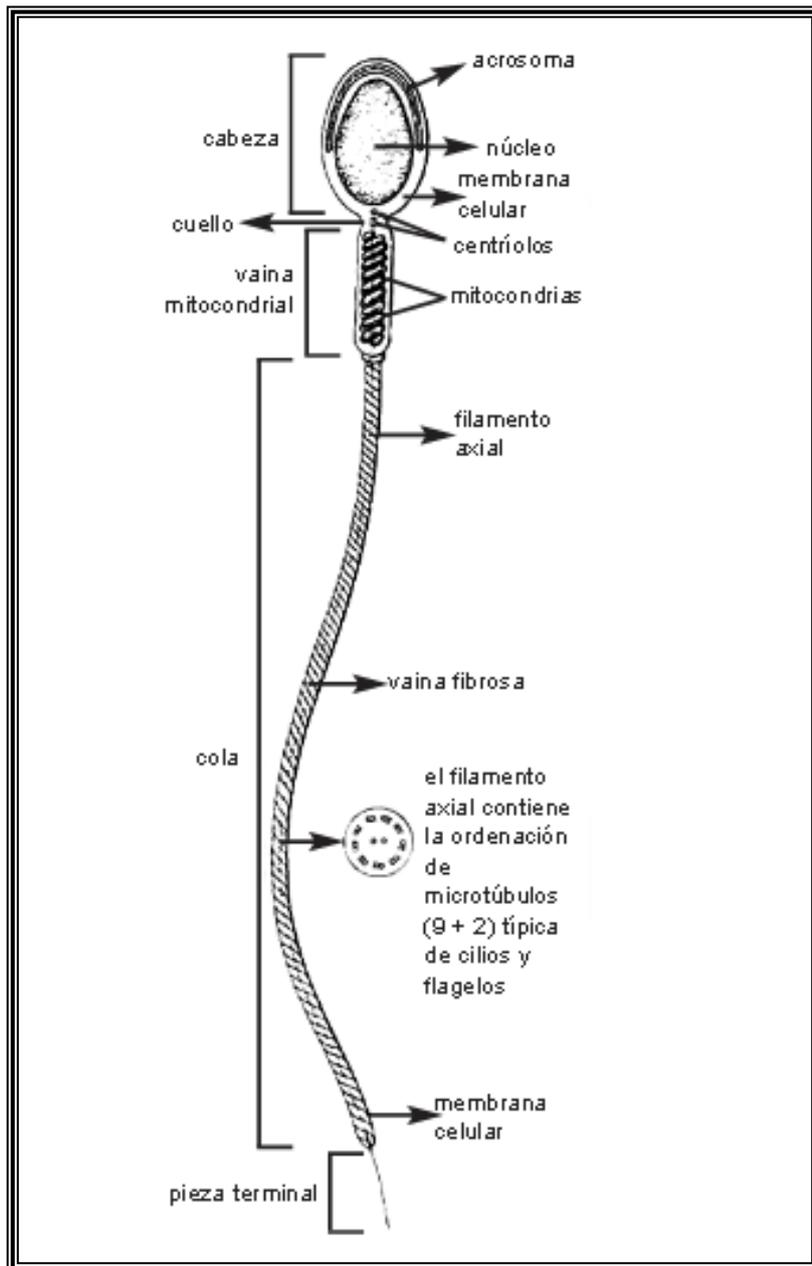


Figura 2. Estructuras del espermatozoide (Garner y Hafez, 1996).

2.2.2.- Morfología anormal

Las anomalías espermáticas se han clasificado en primarias y secundarias (Barrios, 2002). Según la estructura anatómica en la que se generan.

Las anomalías espermáticas primarias se originan dentro del testículo y se deben a fallas en la espermatogénesis (*congénitas*) (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997).

- Estas anomalías incluyen espermatozoides con escaso desarrollo, espermatozoides dobles y defectos de cabeza, entre ellos: protuberancia



acrosómica, cabeza piriforme, cabeza estrecha o delgada, contorno rugoso de la cabeza, espermatozoides microcefálicos y cabezas libres.

- La mayoría de los defectos de la cola del espermatozoide también son considerados anomalías primarias, entre ellas están el defecto en la pieza media, “defecto dag”, presencia de gota citoplasmática proximal, cola fuertemente enrollada, y colas accesorias (Chenoweth, 1997).

Las anomalías espermáticas secundarias son aquellas originadas dentro del epidídimo.

- Entre ellas se encuentran: cabeza ancha, cabezas normales libres, membranas del acrosoma separadas y dobladas, implantación abaxial de la cola, gota citoplasmática distal, colas con curvas suaves, colas enrolladas en la porción terminal (Chenoweth, 1997) (Barrios, 2002).

Se considera que al menos el 70 % de los espermatozoides evaluados deben ser normales (Chenoweth, 1997). El nivel de tolerancia máximo para los defectos de cabeza es de 15-20%, mientras que el nivel de tolerancia para los defectos de acrosoma y cola es de 25% (Blom 1977, citado por Chenoweth, 1997).

La existencia, en la muestra de semen, de células epiteliales, eritrocitos, formación de medusas, células precursoras de los espermatozoides, también se consideran anomalías secundarias (Barrios, 2002). Algunos defectos espermáticos no se pueden definir exactamente como primarios o secundarios (Barrios, 2002). Por ejemplo, la gota citoplasmática proximal y las cabezas sueltas pueden ser defectos originados durante la espermatogénesis (primarios), o un disturbio en la función epididimaria (secundarios) (Chenoweth, 1997) (Barrios, 2002).

2.2.3.- Membrana espermática

Se compone básicamente de lípidos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos que es variable de acuerdo al tipo de especie celular (Avila-Portillo et al., 2006).

La membrana espermática (ME) presenta 5 denominaciones diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola es una



estructura heterogénea y dinámica que, además; participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones específicas que permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del oocito.(Rubio-Guillén, 2009).

La integridad de la ME es esencial para el metabolismo espermático, necesario en varios eventos involucrados en la fecundación, como lo son la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión con el oocito, lo cual, garantiza la fertilidad del macho reproductor. (Watson, 2000).

El paso de congelación-descongelación seminal afecta considerablemente la integridad estructural y funcional de las partes de estas membranas, produciéndose un efecto fatal que baja los resultados de la valoración de motilidad, vitalidad y viabilidad espermática post descongelación (Rubio-Guillén, 2009).

2.3.- PLASMA SEMINAL

El semen del bovino está compuesto de células espermáticas y de plasma seminal. El plasma seminal es una mezcla de secreciones de diferentes partes del aparato reproductor masculino. La importancia del plasma seminal es cuestionable, ya que es posible inducir a la preñez con espermatozoides epididimarios. Sin embargo, dicho plasma parece ser un componente esencial en el apareamiento natural por que actúa como transportador y protector de los espermatozoides (Hafez, 1996).

El plasma seminal contiene concentraciones grandes de ácido cítrico, ergotioneína, glicerilfosforil colina, y sorbitol. Asimismo están presentes cantidades apreciables de ácido ascórbico, aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, ácidos grasos y cuantiosas enzimas (White, 1980) (De Pauw, 2003), además de algunos componentes antimicrobianos como la plasmina seminal (Shivaji *et al.*, 1984) e inmunoglobulinas (Ablin, 1974) (De Pauw, 2003). Se ha descrito un grupo de proteínas ácidas del plasma seminal de bajo peso molecular (13-16 kDa), las cuales se adsorben a la membrana plasmática y desempeñan un papel crucial en la regulación de la capacitación. Estas proteínas, son secretadas por las vesículas seminales, y se han empleado para proteger al espermatozoide contra el estrés térmico y oxidativo. También se han detectado una variedad de sustancias



hormonales incluyendo andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FHS y LH (Mann & Lutwak, 1981).

También se ha encontrado que el plasma seminal no es un medio ideal para el congelamiento de las células espermáticas, a tal punto que altas concentraciones de plasma seminal han demostrado que genera cierto deterioro a las células espermáticas expuestas a congelamiento y almacenamiento, a la vez que reduce la motilidad espermática en el semen del toro, convirtiéndose en un inconveniente para almacenar semen (Pickett, 1975). Una alternativa utilizada para la disminución de la concentración del plasma seminal en eyaculados es la centrifugación, este proceso divide las células espermáticas del plasma seminal facilitando el proceso de remoción de una fracción del plasma para aumentar la concentración espermática y facilitar el trabajo de agregar la proporción adecuada de nutrientes y crioprotectores al semen (Brinsko et al., 2000).

2.4- PRUEBAS DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA

2.4.1.- Concentración espermática

Nos permite evaluar la capacidad de producción de espermatozoides del semental o reproductor y permite calcular el número de dosis a producir por eyaculado. Existe correlación entre la concentración y fertilidad. Se observan variaciones en función del individuo, estación del año, frecuencia y técnica de recogida, etc., si bien la concentración media está entre $800-1000 \times 10^6$ espermatozoides/ml en un eyaculado bovino (González et al., 2013), un aproximado de 1200 millones. (Ribeiro–Peres et al., 2014). Entre los diferentes métodos de evaluación:

- **Cámaras de recuento celular:** *Neubauer / Thoma*. Contaje manual.
- **Espectrofotómetro:** relaciona el grado de absorción de la luz que provocan los espermatozoides diluidos a una concentración conocida, con la concentración de la muestra. Rápido y con menor coeficiente de variación que el anterior (2,9% vs 12,3%) pero los valores pueden verse afectados por contaminaciones.
- **Contadores celulares electrónicos:** cuentan partículas con un tamaño prefijado.



- **Sistemas CASA** (Computer Assisted Sperm Analysis) (González et al, 2013)

2.4.2.-Motilidad individual progresiva

Se realiza tomando una muestra de un eyaculado y se expresa en porcentajes mediante la observación en el microscopio (aumento 40X), colocando 10 μ l de semen puro sobre una lámina de porta objetos a 37°C, y se aprecia diferentes movimientos:

- a. **Progresivo rectilíneo**: espermatozoides con movimiento activo y energético con desplazamiento en sentido de avance o con motilidad individual progresiva (MIP).
- b. **Ondulatorio**: movimiento lento, con pequeño desplazamiento originado por golpes lentos y laterales de la cola en toda su extensión.
- c. **Rotatorio**: movimientos sobre sí mismo con un radio reducido y cierta velocidad (Cuadrado et al., 2012).
- d. **Espermatozoides sin motilidad**: que no tienen la capacidad para movilizarse (Cuadrado et al., 2012) (López et al., 2012).

La escala de medición de espermatozoides vivos con motilidad progresiva valorados según su vigor en escala de 1 al 5, (Galarza, 2013):

- Motilidad del 85 – 100%= 5
- Motilidad del 70 – 84%= 4
- Motilidad del 50 – 69%= 3
- Motilidad de 30 al 49%= 2
- Motilidad < 29%= 1.

2.4.3.- Vitalidad espermática

Se valora indirectamente mediante la integridad de la membrana plasmática. El estudio se hace mediante tinciones:

- **Tinciones no fluorescentes**, Eosina – nigrosina: permite diferenciar entre espermatozoides vivos (no teñidos) y muertos (color rojizo por la penetración de eosina al existir pérdida de la continuidad de la membrana) (González, et al., 2013).

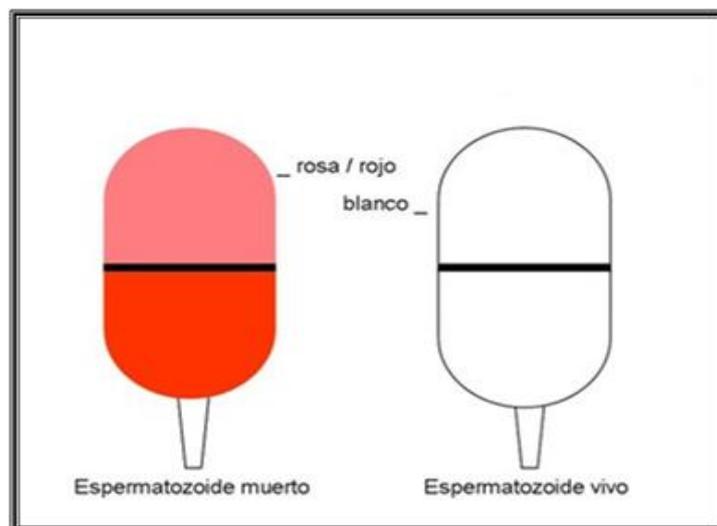


Figura 3. Vitalidad espermática (González et al., 2013).

2.4.4.- Anormalidades

Si la proporción de anormalidades es más del 20%, entonces nos encontramos ante un semen de baja fertilidad y entre las anormalidades más frecuentes se encuentran espermatozoides sin cola, cabeza grande, cabeza pequeña, cola reducida, cabeza adelgazada, rotura de cuello y acrosoma anormal. (Galarza, 2013).

Anormalidades primarias: (congénitas), se desarrolla dentro del testículo Cabeza: piriforme, redondeada, microcabeza, dobles, macrocabeza, diadema; Pieza media: doble, hinchada, doblada, abaxial, incompleta; Cola: enrollada sobre la cabeza. *Anormalidades secundarias:* Cabeza desprendida de la cola, Gota citoplasmática proximal o distal, Cola doblada en cualquier dirección, colas partidas, Acrosoma roto, deforme o desprendido (puntiagudo, abultado, achatado, arrugado, doblado, incompleto, hinchado) (Chenoweth, 1997) (Barrios, 2002).

2.4.5.- Test de endósmosis (HOST)

La prueba hipoosmótica o «hypoosmotic swelling test» HOST, (Jeyendran et al., 1984), nos permite calcular la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante la observación de alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas al ser expuestas a condiciones hipotónicas (incremento de tamaño y flagelos flectados o curvos). Y según Pérez-Llano et al., 1999, la entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Se ha

observado que la suspensión de espermatozoides en un medio hipotónico ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer transmitiendo agua al compartimento intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen (Bredderman & Foote, 1969).

Van der Ven y su equipo (1986) encontraron en semen humano, una correlación alta entre los resultados de la fecundación *in vitro* y el Test de (HOST).

En toros, como en otras especies, se han señalado correlaciones altas y positivas entre el HOST y el porcentaje de espermatozoides vivos, la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y la fertilidad *in vivo* e *in vitro*, tanto del semen fresco como para el semen descongelado (Aisen *et al.*, 2002; Rubio, 2006).

Así mismo, en esta especie, se ha sugerido el uso de fructosa o citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/L (Jeyendran *et al.*, 1984; Correa y Zavos, 1994).

Aunque algunos autores prefieren trabajar a una presión osmótica de 150 mOsm/ L (Zhu & Liu, 2000; Vera, 2001; Rubio *et al.*, 2006 A; Quintero *et al.*, 2007) para evitar falsos negativos producto de la interrupción de la membrana plasmática a causa del estrés hipotónico severo.

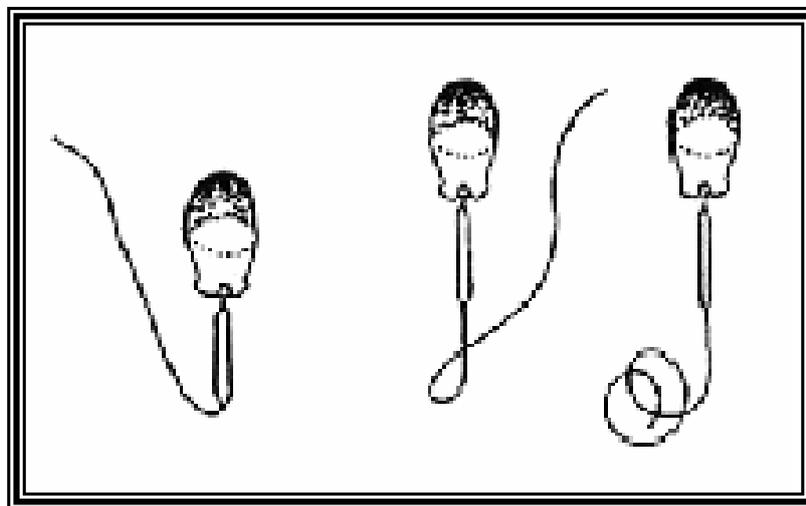


Figura 4. Representación esquemática de espermatozoides reaccionados positivamente al test (Rubio, et al., 2006 A).

2.4.6.- Computer Assisted Semen Analysis (CASA)

Los análisis seminales se han ido tornando de gran importancia en el ámbito de la medicina reproductiva ya que la calidad seminal ha descendido de manera drástica,

de ahí la importancia de las pruebas de laboratorio en donde les permite predecir de forma precisa la capacidad fecundante, al buscar un método adecuado sería interesante que el método analice las muestras rápidamente y que se excluya la subjetividad por lo que se plantearon un método automatizado y objetivo. De esta forma aparece el Computer Assisted Semen Análisis (CASA) desarrollado en la Universidad de Pennsylvania por Liu y Warne en 1977 y mejorado por Amann y Hammersatedt en 1980. Los componentes del sistema CASA, está el microscopio de contraste de fases, que tiene una cámara de video y fotografía, que envía la imagen a una televisión o hacia un monitor y el ordenador que posee el software que analiza las imágenes tomadas por la cámara.

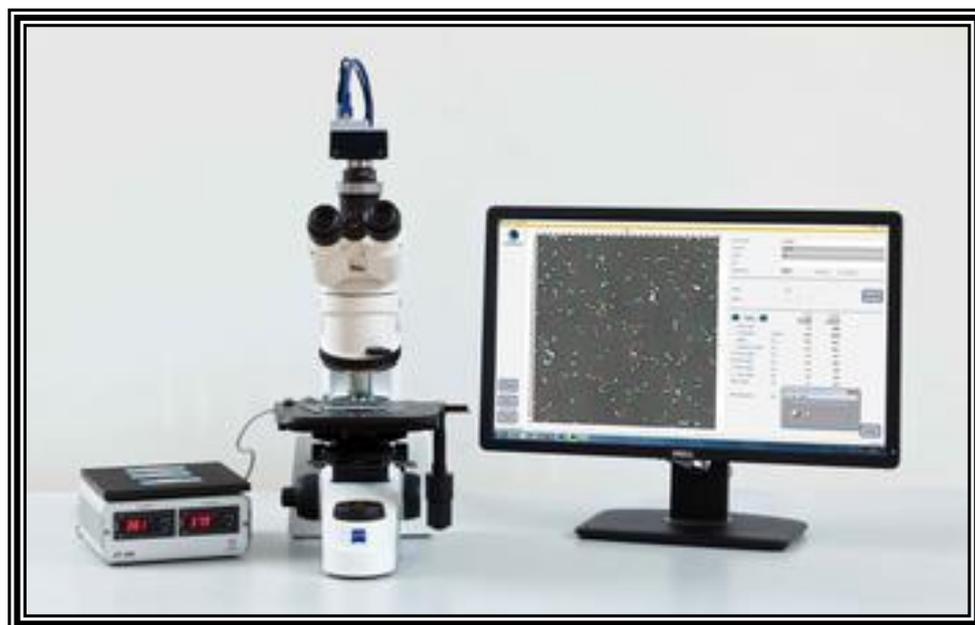


Figura 5. Programa “CASA” con PC. Fuente: (minitube internacional).

Parámetros que mide el sistema CASA:

Velocidad.

VAP: Es la distancia recorrida por espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.

VSL: velocidad según la trayectoria rectilínea. Distancia recorrida entre el primer punto y el último de su trayectoria.

VCL: velocidad según la trayectoria curvilínea. Distancia recorrida a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo. (Cuadrado et al., 2012).



El movimiento de cabeceo o desvío de su trayectoria.

ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (μm).

BCF: Frecuencia de corte de la línea de trayectoria. (Muiño *et al.*, 2006).

La dirección de la trayectoria espermática

LIN: Linealidad. (Es el cociente entre el VSL/VCL).

STR: Rectilineidad. (Es el cociente entre VSL/VAP).

WOB: Índice de oscilación. (Relación porcentual entre la VAP/VCL). (Muiño *et al.*, 2006).

El número de espermatozoides totales y motiles.

MOT: El cual indica el porcentaje de espermatozoides motiles

PRG: Indica el porcentaje de espermatozoides motiles progresivos. Este dato es el que se utiliza al evaluar las dosis inseminante (Cuadrado *et al.*, 2012).

El componente CASA nos permite la valoración de un conteo total de una muestra seminal, la cantidad de espermatozoides móviles y la concentración, así como también todos los valores de velocidad, movimiento lateral, progresivo y lineal de la trayectoria espermática (Brogliatti, 2008). También se acota, el uso del sistema CASA permite no solo evaluar motilidad espermática sino también diferenciar subpoblaciones en relación al tipo de movilidad espermática (espermatozoides que muestran movimientos lineales o de hiperactividad) (Quintero *et al.*, 2007 B).

El sistema CASA nos permite identificar subpoblaciones de espermatozoides que presentan distintos patrones de movilidad que persisten en una misma muestra, se ha demostrado que las diferentes poblaciones responden de manera diferente ante procesos de criopreservación o la exposición de agentes capacitantes.

Los espermatozoides que forman parte de un eyaculado no son uniformes en cuanto a sus características de motilidad, en el mismo eyaculado podemos encontrar espermatozoides que se mueven de forma rápida y progresiva y otros que se mueven de forma más lenta, y por último otros que apenas se mueven. Es interesante conocer estas diferencias, porque probablemente la capacidad fecundante de una muestra de semen sea mejor si la muestra está formada solamente por los espermatozoides más competentes.



Pero el uso de sistemas CASA presenta algunos inconvenientes que es necesario conocer:

- No existe una estandarización y optimización de los equipos y de los procedimientos utilizados en los análisis
- Cada laboratorio utiliza un equipo diferente, con diferentes características técnicas que dan lugar a resultados muy diferentes entre centros.
- A los resultados les afectan diferentes factores como la temperatura de la muestra, volumen, tipo de cámara, concentración de la muestra,... Por ello, es necesario que cada equipo estandarice un protocolo, sabiendo que los resultados serán únicamente aplicables a muestras evaluadas con el equipo en cuestión.
- Se puede tender a una sobreestimación de la concentración espermática, debido a que el aparato puede contabilizar el mismo espermatozoide dos veces por las colisiones espermáticas. Esta sobreestimación se produce en mayor medida cuanto menos diluida este la muestra, ya que disminuyen las colisiones (Cuadrado et al., 2012).



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materiales

Los materiales que se utilizaron para la investigación son los siguientes:

3.1.1.- Recursos biológicos

Se utilizaron 8 pares de testículos de toros provenientes del cantón Santiago de Méndez.

Los testículos que fueron recolectados son de toros faenados de la especie toros *Bos Taurus*, sexualmente maduros, sexualmente activos, con un peso mínimo de 400 Kg a la faena, en una edad entre 3 y 5 años, que han vivido por lo menos 1 año en el trópico, con una Condición Corporal de 2,5 a 3 y con un estado de salud sin signos de enfermedad. Los testículos no presentaban afecciones externas.

3.1.2.- Materiales de laboratorio

Bisturí, Tijeras, Bolsas de sellado hermético, Cajas térmicas (poliestireno), Termómetro, papel toalla, Catéter de N° 18 y 20, Pocillos, Jeringuillas de 3, 5 y 10 cc de dos piezas, hemositómetro de flujo (Spermacúe), Pipetas de 5, 10, 20 y 100 μ l, Porta y cubreobjetos, Microscopio, Placa térmica, Vasos de precipitación de 10ml, 50ml y 100ml, Probetas, Pipetas de 1ml, Varilla agitadora, Refrigeradora, Pajuelas de 0,25 ml de capacidad, Alcohol polivinílico, Nitrógeno líquido, Cámara de flotación para crioconservación en nitrógeno líquido, Baño María, Gradillas, Tubos de eppendorf, Puntas para las micropipetas, Computer Assisted Semen Analysis "CASA".

3.1.3.- Reactivos

Lactato de Ringer, Eosina 5% y Nigrosina 10%, Diluyente seminal: AndroMed®, Fructosa más Citrato de sodio.

3.2.- Caracterización de la unidad de análisis.

Las unidades experimentales y de análisis fueron el análisis del flujo retrógrado del contenido del epidídimo del semen bovino, se realiza la criopreservación, descongelado y; posterior análisis por el método convencional y sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) *Sperm Vision Production-versión 1.01* (Minitube). El universo destinado para la investigación fueron las pajuelas obtenidas por cada epidídimo, con un total de ocho pares de testículos y con dos temperaturas diferentes (5 y 20°C) dando un total de 80 pajuelas (promedio) de 0.25 cc unidades experimentales en estudio.

3.3.- Lugar de la investigación.

El trabajo investigativo de recolección de las muestras (trabajo de campo) y recuperación de testículos se realizó en el cantón Santiago, de la Provincia de Morona Santiago, en la Amazonia ecuatoriana. El análisis, procesamiento del material genético criopreservación y evaluación de calidad espermática post-descongelación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la granja Irquis de la Universidad de Cuenca, que está ubicada en el km 23 de la vía a Girón. El segundo método de evaluación se realizó en la ciudad de Quito, en la Subsecretaría de Fomento Ganadero – MAGAP con el sistema CASA.



Figura 6. Camal Municipal del cantón Santiago. Fuente: Google Earth

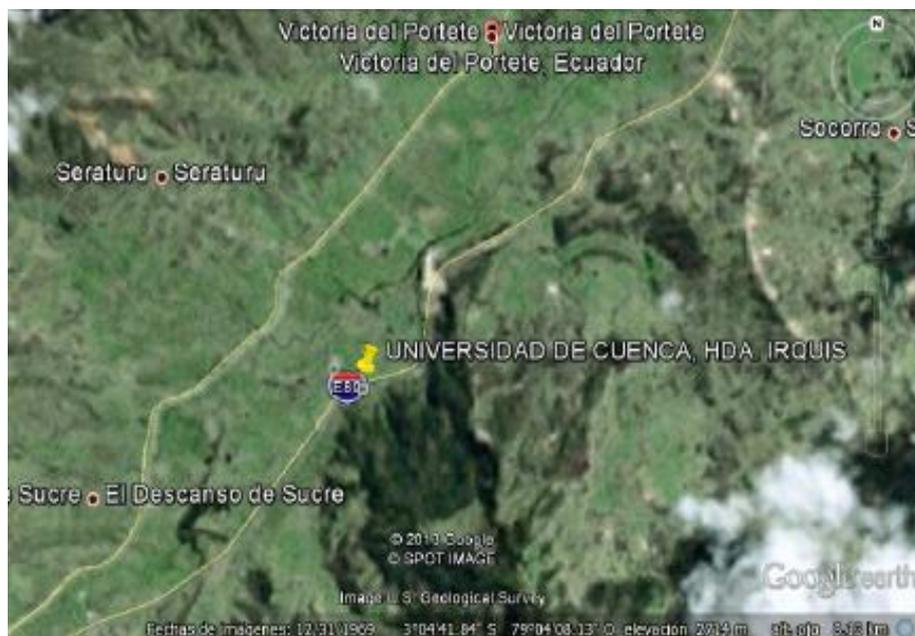


Figura 7. Granja Experimental IRQUIS - Universidad de Cuenca. Fuente: Google Earth.

3.4.- Metodología de trabajo

3.4.1.- Recolección de testículos de camal

Se usaron 8 pares de testículos (16 epidídimos) de toros *Bos taurus*, que se recolectaron en el camal del cantón Santiago de Méndez en donde se recibió los testículos con el escroto incluido para después realizar a través de una disección dejar envuelto el testículo, solo con la túnica vaginal. Se evitó que los testículos tomen contacto con partes sucias para impedir contaminaciones con los escrotos. Cada testículo se colocó en bolsas de sellado hermético de plástico estériles con Lactato de Ringer a una temperatura de 5°C y 20°C, respectivamente y en cajas de polietileno para su traslado al Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la Granja Irquis de la Universidad de Cuenca el tiempo de almacenamiento o de transporte fue de 6 horas. Cada bolsa fue identificada correspondiente en orden y temperatura a almacenarse.



3.4.2.- Recuperación de espermatozoides del epidídimo por flujo retrógrado

De acuerdo al grupo de investigación dependiendo de la temperatura de almacenamiento, se sacó los testículos en forma ordenada de las bolsas plásticas, previo a la recuperación de espermatozoides se preparó la solución madre con AndroMed® 20% a 37°C mas agua destilada y precalentada a 37°C, colocando el agua sobre el AndroMed® y mezclando las soluciones.

El procedimiento de lavado retrógrado fue el siguiente:

Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se diseccionaron mediante el uso de implementos y técnicas asépticas. Se removió la túnica serosa testicular y los vasos sanguíneos con un bisturí y tijera recta. Se localizó el septum (indentación) del epidídimo, correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo, se realizó un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del epidídimo se reduzca, para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles. La porción diseccionada, la cola del epidídimo se colocó en una placa de Petri precalentada a 37°C (en una platina térmica) y se mantuvo la porción libre de los vasos deferentes firmemente sujeta con los dedos pulgar e índice, para evitar que resbale el tejido. Los catéteres de plástico con punta roma que son desechables para el lavado fueron de diferentes calibres 18, 20 ó 22, esto va a depender según el diámetro interno de cada vaso deferente, dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptó una jeringa de dos piezas, con "medio de lavado" (medio de congelación AndroMed® 20% a 37°C más agua destilada y precalentada a 37°C) y con esta jeringa se perfundió (un ml) lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. En las paredes de los vasos deferentes se aplicó presión con los dedos de una mano contra el catéter de plástico para evitar pérdida del líquido del lavado. A medida que se perfundían los vasos deferentes con el medio de lavado se observó un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, apareció en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario, representado por un líquido espeso y de un color crema pálido o blanco cremoso, dependiendo de la concentración espermática obtenida (Brooks, 1979) (Barrios, 2006).



3.4.3.- Evaluación de viabilidad espermática

A continuación se realizó las pruebas de concentración y viabilidad espermática, para verificar el estado de las muestras para continuar o no con el procesamiento hasta su congelación.

3.4.3.1.- Concentración espermática

Las pruebas de concentración espermática se realizaron con un Espectrofotómetro, que funciona con la luz de una lámpara y sus ondas atraviesan la muestra y el receptor (foto celda) evalúa la luz efectivamente transmitida que está al otro lado de la muestra. Se relaciona el grado de absorción de la luz que provocan los espermatozoides. Es tan rápido y con menor coeficiente de variación (2.9%) pero los valores pueden verse afectados por contaminaciones. El espectrofotómetro que se utilizó lleva microcubetas de 10 mm en donde se coloca la solución extraída del epidídimo, seguidamente se colocó en la Spermacúe (Minitube- Alemán) y luego de unos segundos nos da el resultado en $\times 10^6$ por ml.

3.4.3.2.- Motilidad individual progresiva (MIP)

Se desarrolló con cada muestra la extracción por flujo retrógrado en sus diferentes muestras para realizar la evaluación antes de la dilución y la crioconservación y el resultado se expresa en porcentajes, mediante la observación en el microscopio (lente 20X), colocándose 10 μ l de solución extraída del epidídimo, sobre la lámina de porta objetos a 37°C, y sobre éstas se colocó un cubre objeto con la misma temperatura.

Se apreciará diferentes movimientos y la calificación que se da a las muestras es subjetiva.

La escala de medición que se utilizó para evaluar a los espermatozoides vivos con motilidad progresiva, fueron valorados según su vigor en una escala del 1 al 5, según (Galarza, 2013):

Motilidad del 85 – 100%= 5

Motilidad del 70 – 84%= 4



Motilidad del 50 – 69%= 3

Motilidad de 30 al 49%= 2

Motilidad < 29%= 1.

3.4.4.- Procesamiento del contenido epididimario

El procesamiento del semen se realizó después de haber pasado las pruebas de evaluación del semen recuperado en donde nos tienen que dar resultados positivos para continuar con el procesamiento para la crioconservación.

3.4.4.1.- Ajuste de dosis inseminante

3.4.4.1.1.- Como se determinó el N° de pajuelas del esperma recolectado

Por lo general se requieren de 10×10^6 espermatozoides viables en el momento de la inseminación. Sin embargo, en condiciones de campo se considera que más de un 50% de las células pueden morir durante alguna fase del proceso de congelación–descongelación, por lo que se debe poner un mínimo de 20×10^6 espermatozoides por dosis inseminante. (Galarza, 2013). En base a esto se determinó aumentar el número de espermatozoides a 50×10^6 espermatozoides por dosis inseminante. Para obtener el N° de pajuelas del esperma recolectado se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{No. Pajuelas esperadas} = \frac{\text{Volumen} * \text{concentración} * \% \text{ Motilidad} * \% \text{ Vivos}}{\text{Concentración de espermatozoides por pajuela}}$$

3.4.4.1.2.- Como se determinó la cantidad de diluyente necesario

Los espermatozoides totales (por dosis) deben estar suspendidos en un volumen final de 0,25 ml (pajuela). Para agregar la cantidad de diluyente necesario se trabajó con la siguiente fórmula:



$$\text{Diluyente Total} = (\text{Pajuelas esperadas} * 0,25 \text{ ml}) - (\text{Volumen obtenido FR})$$

- (FR= flujo retrógrado)
(Galarza, 2013).

3.4.4.2.- Preparación del diluyente

En la preparación del diluyente se utilizó *AndroMed®*, con la composición al 20%, en si es mezclar 20 ml del *AndroMed®* con 80 ml de agua bidestilada a 37°C, en la práctica se realizó 8ml agua destilada a 37°C y 2ml de *AndroMed®*. Para mezclar el *AndroMed®* con el agua bidestilada, primero se debe de aplicar al frasco el *AndroMed®* y luego el agua destilada misma que debe de estar a 37°C. Esta solución que se preparo es estable y puede guardarse en refrigeración a 5°C por un par de horas y cuando se lo va a utilizar se lo tiene que abrigar en Baño María.

3.4.5.- Dilución

El esperma recolectado del epidídimo, tienen un volumen aproximado a 1 cc, estos contenidos se transfieren a los tubos vacutainers (respetando el orden e identificación de cada uno de las muestras), en donde se agregó la cantidad necesaria del diluyente *AndroMed®*, hasta obtener la cantidad suficiente para elaborar las pajuelas con 50×10^6 de espermatozoides.

3.4.6.- Preparación de pajuelas y rejillas

Se identificó cada una de las pajuelas con la identificación de los testículos, así como la temperatura que ha sido almacenada durante su transporte hasta que llegó al laboratorio, esta actividad se realizó manualmente en todas las pajuelas con marcador de punta fina y permanente. Al mismo tiempo se arregló las rejillas y envases en donde se colocaron las pajuelas elaboradas, debidamente rotuladas.



3.4.7.- Empajuelado

El envasado de las pajuelas para sus diferentes tratamientos se realizó una vez pasado el tiempo de equilibrio que es de 2 horas a una temperatura de 5°C, el llenado de las pajuelas fue absorbiendo manualmente y el sellado es con alcohol polivinílico en su extremo libre, esta práctica se realizó a 5°C promedio.

3.4.8.- Crioconservación

La crioconservación de las pajuelas para los diferentes tratamientos se realizó de la siguiente manera, se efectuó sobre una rampa colocada en el Nitrógeno líquido a una altura de 4 cm en el vapor del nitrógeno líquido, por un lapso de 15 a 20 minutos, inmediatamente se dejó caer las pajuelas en el nitrógeno líquido, de esta manera se logró que llegue a una temperatura de – 196 °C, que es la temperatura del nitrógeno líquido.

3.4.9.- Descongelamiento

El descongelamiento se realizó pasado los 7 días de haber criopreservado las pajuelas, colocando en un baño María a una temperatura de 37°C por 1 minuto para su posterior evaluación. El mismo proceso se desarrolló para los dos tratamientos.

3.4.10.- Evaluación post-descongelado

Para su evaluación se realizaron las siguientes pruebas de viabilidad espermática MIP, VE, Anormalidades y la prueba de Host. Cada prueba se realizó con su respectiva técnica en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la granja Irquis de la Universidad de Cuenca, según el método convencional. Y la evaluación sistematizada con CASA (Computer Assisted Semen Analysis), se realizó en la ciudad de Quito en la Subsecretaría de fomento ganadero – MAGAP.

3.4.10.1.- Motilidad Individual progresiva (MIP) espermática

Se ejecuto por dos métodos:

- El convencional y,
- El computarizado (CASA).



3.4.10.1.1.- Método convencional-MIP

Para hacer esta evaluación se realizó colocando una gota gruesa de la pajilla de aproximadamente 10 μ l colocándolo sobre un portaobjetos temperado a 36-37°C y se colocó sobre ésta un cubreobjetos con la misma temperatura. Se observó en el microscopio, siempre sobre la platina térmica a 36-37°C, con el lente de 10X y 20X.

Se observó varios campos (tres como mínimo) y se valoró subjetivamente los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea, los que giran en círculo o avanzan en forma oscilatoria.

3.4.10.1.2.- Computer Assisted Semen Analysis (CASA)-MIP

Se utilizó para la evaluación del MIP el programa de Minitube. La preparación de la muestra, se colocó las pajuelas en un baño María a 38 °C, el contenido se pasó a los tubos de eppendorf que están en la platina térmica a 38°C. Se diluyó la muestra al grado de 1:10 con AndroMed® (1 parte del contenido de la pajuela + 9 del diluyente) ó 1:20 si las concentraciones son muy altas, la valoración se realiza colocando una gota aproximadamente de 5 μ l no debe ser superior porque dificulta su observación, la muestra debe colocarse sobre un porta objeto temperado a 38°C de igual manera el cubre objeto estos deben estar libres de polvo y otras sustancias para una buena evaluación. Las muestras se analizaron inmediatamente después de su preparación, en cada campo se debe observar a los espermatozoides separados para que puedan desplazarse libremente. Se evaluó al menos 5 campos diferentes y es muy importante seleccionar para la evaluación campos que muestren buena motilidad y no estén ubicados en los bordes del cubre objeto. La valoración que da el programa Sperm Visión es en porcentaje de espermatozoides motiles que va dentro de un rango de 0% (ningún espermatozoide móvil) hasta 100% (todos los espermatozoides en movimiento). Cada uno de los campos, se estimó el porcentaje de células con movimiento, asignando a cada uno de ellos a 1 de las 3 categorías, inmóvil, movimiento local, o movimiento progresivo.



3.4.10.2.- Vitalidad espermática

Se evaluó colocando una gota aproximadamente de 5 μ l del contenido de las pajillas que están con una temperatura aproximada a los 36-37°C y se mezcla con una esquina del cubre objeto temperado por 10 segundos con una gota de nigrosina y dos gotas de eosina temperadas a 36-37°C, y se utilizó el mismo cubre objeto para hacer un frotis, posterior a esto se dejó secar sobre la platina térmica para proceder a la lectura.

Para tener el porcentaje de espermatozoides vivos se observó el frotis en el microscopio con el lente de 10 X y 20 X, se contó no menos de 200 células y se sacó un porcentaje, se considera como vivos a los no teñidos por que poseen una membrana intacta y muertos a los espermatozoides teñidos de rojo porque el colorante penetra la membrana celular y lo colorea.

3.4.10.3.- Anormalidades espermáticas

Se realizo por dos métodos:

- El convencional y,
- El computarizado (CASA).

3.4.10.3.1.- Método convencional-anormalidades espermáticas

Para la evaluación de las anormalidades en el laboratorio se procedió a la evaluación de las mismas placas preparadas para vitalidad espermática, para obtener los resultados de este proceso se observo en el microscopio con el lente de 20X y 40X, se determina contando unas 200 células por portaobjeto y luego se determina sacando un porcentaje. Se pudo observar con más frecuencia las anormalidades como: Cabeza desprendida de la cola, Gota citoplasmática proximal o distal y Cola doblada en cualquier dirección.



3.4.10.3.2.- Computer Assisted Semen Analysis (CASA)- anormalidades espermáticas

Se manejó el software computarizado usando el programa Sperm Visión production. La tinción que se utilizó para anormalidades fue la de nigrosina y eosina. Se evaluó colocando una gota aproximadamente de 10 μ l del contenido de los tubos de eppendorf que contiene el esperma en una esquina de la placa cerca de esta se coloca la una gota de nigrosina y las dos gotas de eosina. Luego se mezcla con una esquina de un cubre objeto, y se utilizó el mismo cubre objeto para hacer un frotis, posterior a esto se dejó secar sobre la platina térmica para proceder a la lectura. La evaluación se colocó el frotis en el microscopio con el lente de 20X, y en la pantalla del monitor se va marcando con colores a los espermatozoides anormales y normales, que se ah realizando es de forma subjetiva en donde se tiene que calificar a los espermatozoides normales y anormales según el criterio del laboratorista, la valoración va hasta los 100 espermatozoides dando un valor en porcentaje. El frotis se hizo lo más fino para poder observar bien las anormalidades en el monitor, cuando la concentración estuvo muy alta se hizo una dilución a un grado 1:10, para concentraciones bajas, se disminuye el grado de dilución a 1:5, para diluir el semen se puede utilizar una solución de Cloruro de sodio (0,9%), o la solución de AndroMed® al 20%.

3.4.10.4.- Prueba de endosmosis de la membrana (HOST)

Esta prueba consiste en colocar 200 μ l de solución hiposmótica (100 ó 150 mOsm/L) en la estufa a 37°C por 30 minutos, consecuentemente se agregó 20 μ l del líquido descongelado provenientes de las pajuelas y se incubo a la misma temperatura por 60 minutos. Luego se colocó 10 μ l de la sustancia que estuvo en la estufa sobre un portaobjetos templado a 36-37°C y se ubica sobre ésta un cubreobjetos, con la misma temperatura y lo dejamos secar por unos 60 segundos en la platina térmica para observarlo con lente de 20X y 40X en el microscopio. Se contaron en el microscopio hasta un total 100 espermatozoides y de ahí se sacó un



porcentaje de células que reaccionaron al test. Se consideró como positivo a los espermatozoides que presentaban una reacción de las colas dobladas o enrolladas.

3.5.- Diseño estadístico

Este trabajo se encuentra dentro de un tipo de estudio experimental y se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA), los resultados fueron sometidos a la prueba de homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Levene cumpliendo con el supuesto de normalidad de datos, y posteriormente se realizó el análisis de varianza (ADEVA) para comparar los dos grupos y establecer significancia. Los datos fueron analizados en el programa estadístico SPSS versión 22, con un nivel de significancia con el 95% de confiabilidad.

Además, fueron sometidos a un análisis multivalente, donde se agrupó las cuatro variables: MIP, VE, Anormalidades morfológicas y HOST, en una sola variable que se definió como viabilidad espermática pos-descongelación y se relacionó con los dos grupos de temperatura para luego ser sometidos a un Análisis Multivariante De La Varianza (MANOVA), con un nivel de significancia exigido de $p \leq 0.05$.



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1.- Motilidad espermática individual progresiva de espermatozoides epididimarios recuperados

Al evaluar la MIP de los espermatozoides recuperados del epidídimo por la técnica de flujo retrógrado que provienen del almacenamiento a dos temperaturas, se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 1. Valores porcentuales promedios y significación del MIP pre-congelación de espermatozoides epididimarios provenientes de dos temperaturas

Variable	Temperatura (°C)	N	Media	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
Motilidad Individual Progresiva (MIP)	5	6	84,2 ^a	1,54	80,2	88,1
	20	6	67,5 ^b	7,04	49,4	85,6

Letras distintas expresan diferencias significativas ($p < 0,05$)

Al realizar el Análisis estadístico los resultados fueron sometidos a la prueba de homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Levene, cumpliendo el supuesto de normalidad de datos. Al realizar el análisis de varianza (ADEVA), se probó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) mostrado en el Anexo 1, y por lo tanto, el grupo con menor temperatura 5°C (Tabla 1), mostró mejores porcentajes de MIP, con un $84,2 \pm 1,54\%$.

4.2.- Viabilidad espermática post-descongelados

Luego del procesamiento y crioconservación de los espermatozoides epididimarios recuperados, se realizó la crioconservación en pajuelas de 0,25 ml, realizando un análisis porcentual para cada grupo en estudio se obtuvieron los siguientes valores:

Tabla 2. Valores porcentuales promedios y significación de MIP, VE, Anormalidades morfológicas y pruebas de HOST post-descongelación realizado a espermatozoides epididimarios provenientes de dos temperaturas

Variables de viabilidad espermática	Temperatura (°C)	N	Media (%)	Error estándar (%)	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior (%)	Límite superior (%)
Motilidad Individual Progresiva (MIP)	5	40	33,4 ^a	2,42	28,5	38,3
	20	18	22,8 ^b	2,81	16,9	28,7
Vitalidad Espermática (VE)	5	40	63,0 ^a	2,61	57,7	68,3
	20	18	52,9 ^b	2,96	46,7	59,2
Anormalidades morfológicas	5	40	31,6 ^a	1,45	28,6	34,5
	20	18	33,8 ^a	2,85	27,8	39,8
Endósmosis membrana (HOST)	5	40	31,3 ^b	1,99	27,2	35,3
	20	18	40,4 ^a	3,26	33,6	47,3

Letras distintas expresan diferencias significativas (p<0,05)

En la tabla 2, se aprecia los valores porcentuales promedios de las variables en estudio en los dos grupos de investigación, obteniendo mejores resultados para el grupo con 5°C en MIP y VE, pero para Anormalidades morfológicas se obtuvieron



valores similares, sin embargo para la variable integridad de la membrana con la prueba de HOST, fue superior el grupo con 20°C.

Al realizar el análisis estadístico, los datos cumplen el supuesto de normalidad mediante la prueba estadística de Levene, y consecuentemente según el ADEVA (Tabla 2) se determinó que para las variables MIP y VE existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), que favorecen al grupo de 5°C, sin embargo, para la variable Anormalidades espermáticas no se encontró diferencias ($p > 0,05$), comportándose los dos grupos de igual manera. Al analizar la variable endósmosis de la membrana espermática pos-descongelación mediante la prueba de HOST, se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos en estudio, mostrando mejores resultados el grupo de 20°C de almacenamiento (Anexo 2).

También, los resultados fueron sometidos a un análisis multivariante, donde se agruparon las cuatro variables: MIP, VE, Anormalidades morfológicas y HOST en una variable canónica que llamaremos “Calidad espermática” y se comparó con los dos grupos de estudio y se probó que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos de temperatura con relación a esta variable (Anexo 3).

4.3.- Datos de Motilidad según el sistema CASA

Dentro de la evaluación de viabilidad espermática y como actividad paralela a las pruebas realizadas en el laboratorio de Irquis, se evaluó también pajuelas de 0,25 descongeladas usando el equipo CASA, que es un sistema computarizado que mide algunas variables cinéticas de los espermatozoides de acuerdo a un software, en donde se encontraron los siguientes datos:

Tabla 3. Valores promedios y error estándar de Motilidad y Anormalidades realizados a espermatozoides epididimarios descongelados en los dos grupos en estudio con el sistema CASA.

Variables analizadas por el Sistema CASA	Temperatura (°C)	N	Media (%)	Error estándar (%)	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior (%)	Límite superior (%)
Motilidad Total	5	4	52,0 ^a	9,55	21,6	82,4
	20	4	59,3 ^a	11,06	24,1	94,6
Motilidad Individual Progresiva	5	4	27,5 ^a	7,77	2,8	52,2
	20	4	30,9 ^a	6,70	9,5	52,2
Motilidad Local	5	4	24,5 ^a	2,43	16,8	32,2
	20	4	28,5 ^a	4,43	14,4	42,6
Espermatozoides Inmóviles	5	4	48,0 ^a	9,55	17,6	78,4
	20	4	40,6 ^a	11,06	5,4	75,9
Anormalidades	5	4	43,3 ^a	2,93	33,9	52,6
	20	4	39,5 ^a	4,41	25,5	53,5

Letras distintas expresan diferencias significativas (p<0,05)

En la (tabla 3) se muestran los valores promedios y su variabilidad de las variables analizadas en el sistema CASA. En el análisis estadístico de estas variables evaluadas por el sistema CASA, se sometieron los resultados para cumplir los supuestos, obteniendo normalidad en los datos según la prueba estadística de Levene. Posteriormente se realizó un ADEVA y se determinó que todas las variables analizadas como Motilidad Total, progresiva (MIP), local, espermatozoides inmóviles y anormalidades morfológicas, no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$), por lo tanto, las variables enunciadas anteriormente se comportaron de igual manera en los dos grupos de temperatura de almacenamiento (Anexo 4).



CAPITULO V: DISCUSIÓN

Ribeiro-Peres et al., (2014), realizó un trabajo en Brasil en 22 epidídimos de toros provenientes o colectados de las plantas faenadoras. Estos fueron manteniéndolos a una temperatura de 37°C y trasladados por 10 minutos. Las pajillas eran con una concentración estándar de 50×10^6 espermatozoides móviles, y fueron evaluados los métodos de criopreservación convencional y automatizado de espermatozoides colectados de la cola del epidídimo de toros post mortem. En donde obtuvo los siguientes resultados: Motilidad %: en fresco, $74,5 \pm 5,2$; congelación convencional, $29,5 \pm 14,9$; congelación automatizada, $25,5 \pm 12,1$. HOST %, en fresco, $69,7 \pm 9,2$; Congelación convencional, $60,2 \pm 10,0$; congelación automatizada, $59,6 \pm 11,4$. Viabilidad %, en fresco, $69,4 \pm 10,7$; congelación convencional, $53,9 \pm 11,8$; congelación automatizada, $52,7 \pm 9,0$. De los espermatozoides frescos presentaron resultados superiores ($P < 0,05$). Para el parámetro de integridad estructural de la membrana plasmática (hiposmótica) las muestras de espermatozoides frescos no tuvieron alteraciones significativas cuando comparadas con muestras de espermatozoides congeladas por el método convencional. Las muestras de espermatozoides frescos tuvieron alteraciones significativas al compararlas con el método automatizado. En todos los parámetros realizados, las muestras de espermatozoides congelados por el método convencional y automatizado no presentaron diferencias significativas cuando comparadas entre sí. No fue observada ninguna correlación para los mismos parámetros en las muestras de espermatozoides frescos o congelados por el método automatizado.

Para Motilidad en fresco están similares los resultados con relación a los conservados a 5°C y en cuanto a la evaluación convencional pos-descongelación nuestros resultados están ligeramente superiores. En el test de HOST obtuvimos resultados inferiores con una diferencia de 19,8 con la de 20°C que tuvimos los mejores resultados. En Viabilidad obtuvimos buenos resultados con una diferencia de 9,1 puntos con la de 5°C.



Amann et al., (1973) en Pennsylvania de State University, EEUU, ejecutó un trabajo con 7 toros de los cuales se practicó una cirugía, para comparar la fertilidad de los espermatozoides de bovinos, en donde dio unos resultados de:

MIP: inicial de 65 %; a las 24 horas, 43%. Concentración; $5,11 \times 10^6$.

Los porcentajes de óvulos fertilizados fueron 0% para espermatozoides testiculares, el 84% para esperma epidídimo caudal, y el 94% para el esperma eyaculado. La capacidad de fertilización de la cola del epidídimo y el esperma eyaculado no fue significativamente diferente.

En comparación los resultados de MIP están bajos en relación a nuestro trabajo, porque pasado las 6 horas tenemos un resultado promedio de $84,2 \pm 1,54$ con los mejores resultados a 5°C .

Barbosa et al., (2012) en la ciudad de Franca, SP, Brasil. Realizó la evaluación de los efectos de la congelación sobre la integridad y funcionalidad de los espermatozoides del epidídimo bovino pos-mortem. En 20 epidídimos de toros recogidos de un matadero comercial almacenados en frío. Los resultados fueron los siguientes: Volumen en fresco $6,3 \pm 2,1$; Motilidad %; en fresco $74 \pm 7,0$, congelación, $30,0 \pm 8,2$; Concentración; en fresco $5,2 \pm 3,8$; el test de HOST %, congelación $72,9 \pm 10,4$; y Espermias Normales: $62,7 \pm 8,5$. Existiendo una diferencia significativa en cuanto a motilidad. Al comparar con nuestro resultado la MIP en fresco están bajos en relación a nuestro trabajo, porque pasado las 6 horas tenemos un resultado promedio de $84,2 \pm 1,54$ con los mejores resultados a 5°C y en pos-descongelado de igual forma $33,4 \pm 2,42$; en el test de HOST tenemos mejores resultados para 20°C con $40,4 \pm 3,26$. Para el análisis de morfología los espermias de 5°C tienen un mejor resultado con 68,4 vs 62,7.

Formighieri et al., (2013) en Paraná, Brasil, realizaron el estudio sobre espermatozoides de toros recogidos de la cola del epidídimo almacenados a $18-20^{\circ}\text{C}$. el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de los espermatozoides de



toro recogido de la Cola del epidídimo almacenado a 18-20 °C, lo que se compara con esperma recogido por el método electro-eyaculación y conservados a 5 °C. Y se dio los siguientes resultados; en el semen recuperado; A las 6 horas motilidad 67.5 ± 11.9 , anormalidades 9.5 ± 3.1 ; A las 12 horas motilidad 66.25 ± 7.5 , anormalidades 18 ± 3.9 ; A las 18 horas motilidad 67.5 ± 2.8 , anormalidades 21.25 ± 6.1 ; A las 24 horas motilidad 58.75 ± 8.5 , anormalidades 19.5 ± 3.1 ; A las 30 h motilidad de 41.25 ± 7.5 ; anormales de 26.5 ± 3.1 ; Evaluación de los espermatozoides de la cola del epidídimo no mostró disminución significativa en cuanto a motilidad de los espermatozoides hasta 24 h, con sólo una disminución significativa se produce en el grupo de 30 horas. El esperma recogido por el método electro-eyaculación difieren de su contraparte al recogido desde la cola del epidídimo a diferentes horas para la presentación de mayor movilidad, el vigor y menos defectos morfológicas en espermatozoides que tiene un diferencia significativa ($p < 0,05$).

Los resultados de MIP pasado las 6 horas tenemos un resultado promedio de $84,2 \pm 1,54$ con los mejores resultados a 5°C, vs 67.5 ± 11.9 , de Formighieri, M., y sus colaboradores en el (2013) porque ellos no crioconserveron las muestras.

En el Distrito Federal, de Brazil, Martins et al., (2009). Realizaron el presente estudio para evaluar el efecto del intervalo entre la muerte del animal y la recuperación de espermatozoides en la congelabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides del epidídimo de toros almacenados por diferentes períodos de tiempo. En testículos de 25 toros, refrigerados a 5°C y se crioconserveron pajuelas de 15×10^6 de espermas. El porcentaje del total de espermatozoides anormales fue 36,68%. Con presencia de gotas citoplasmáticas (26,62%). Después de 24 h de almacenamiento a 5 °C no se observó ningún cambio en la motilidad total cuando se compara con los valores del grupo de referencia. Sin embargo, se produjo una disminución a las 48 h de almacenamiento, que se mantuvo sin cambios hasta 72 h. Criopreservación tuvo un efecto perjudicial sobre la calidad del esperma, a excepción de la motilidad progresiva que mostraron valores similares antes de la congelación y después de la descongelación. Acrosoma y la integridad de la



membrana plasmática se vieron afectados, no sólo por criopreservación, sino también por el período de tiempo que se almacenaron los epidídimos. Nuestros resultados están con resultados más positivos en cuanto al MIP antes de la congelación y viceversa con los resultados posdescongelación y con las anomalías espermáticas muy próximos 31,6 vs 36,68% con los datos de Martins, C.F. y colaboradores (2009).

Martins, C.F., Rumpf, R., Pereira, D.C., Dode, M.N (2007), en Brasilia, Distrito Federal, Brasil, trabajaron en el tema de la La criopreservación de espermatozoides del epidídimo bovino de animales muertos y sus usos en la producción in vitro de embriones, con el objetivo de Evaluar la viabilidad y la fertilización in vitro con espermatozoides criopreservados del epidídimo obtenido de animales muertos. Realizó con los epidídimos de 3 toros, 7 horas después de muertos los animales y se crioconservo en nitrógeno líquido. Los resultados dio motilidad en fresco de epidídimos de 70 - 80% y de un eyaculado fue de 80-90%. Sin embargo, al comparar antes y después de la criopreservación de una se observó disminución de la motilidad por animales A1 (80 y 60%), A2 (80 y 70%) y referencia toro (90 y 80%). La media de la concentración de esperma fue 440×10^6 espermatozoides / cada epidídimo y de 800×10^6 espermatozoides/ml de un eyaculado. En crioconservado se observó un mayor porcentaje de células anormales en la recuperación de espermatozoides de epidídimo de todos los toros, siendo 54, 48 y 40% para A1, A2 y A3; y del 23% en un eyaculado.

Los resultados de este trabajo estuvo muy parecidos al que se vino desarrollando en MIP antes de la congelación, para MIP pos descongelación se obtuvo un descenso más marcado($33,4 \pm 2,42$) y un menor número de células anormales con un $31,6 \pm 1,14$ almacenado a 5°C.

La motilidad individual progresiva determinada visualizando el movimiento progresivo de cada uno de los espermatozoides en el microscopio y es una prueba subjetiva que se requiere de una buena experiencia para hacer dicha evaluación (Hafez & Hafez, 2000). Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides



móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

Cuando aparezcan anomalías en un eyaculado la fertilidad del reproductor puede verse afectada, pero realmente no se sabe cuál es el porcentaje máximo de morfoanomalías espermáticas que puede ser compatible con una fertilidad normal. Lo que se está demostrado es que existe una correlación negativa entre el número de formas anormales y la fertilidad del semental (Barth y Oko, 1989; Januskauskas y Žilinskas, 2002). A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, desciende la capacidad fecundante del mismo (Howard y Pace, 1998). Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% (Barth y Oko, 1989) han de descartarse para la congelación.

Al respecto la correlación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis seminales hay diferencias entre autores. Decuadro y col. (2002) y Christensen y col. (2004) explican de una correlación elevada entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis, cuando se respete una concentración espermática mínima por pajueta. Sin embargo, Graham (2001) observó que la viabilidad espermática apenas se correlacionaba con la fertilidad. Los marcadores para viabilidad espermática pueden usarse en combinación con otros fluorocromos que permiten valorar otras estructuras del espermatozoide, como la integridad de la membrana acrosomal o la funcionalidad mitocondrial.

El uso de sistemas CASA para las evaluaciones seminales ofrece notables ventajas pero también posee algunos inconvenientes. Uno de los principales es que no existe una estandarización y optimización de los equipos y de los procedimientos empleados en los análisis (Verstegen y col., 2002).

Según Verstegen et al., (2002) entre los principales factores de los que depende el resultado final están la temperatura de análisis del semen, el volumen analizado, el tipo de cámara utilizada, el tiempo que transcurre entre la recogida y el análisis, la concentración espermática de la muestra, el diluyente utilizado, el objetivo del microscopio utilizado en el análisis y la iluminación.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1.- CONCLUSIONES

Se concluye que, la calidad post- descongelación de los espermatozoides fue distinta en los dos grupos, pero a 20°C y 6 horas de almacenamiento se obtuvo resultados inferiores de calidad espermática post-descongelación rechazando lo planteado (Ha), a excepción de la pruebas de HOST. Conforme a esto se determinó que:

- I. Los dos grupos de testículos fueron diferentes al analizar la MIP y VE en espermatozoides epididimarios recuperados, mostrando superioridad con una temperatura de 5°C y 6 horas de almacenamiento, rechazando la propuesta planteada del proyecto.
- II. Al analizar la calidad post-congelación, existió diferencias significativas con valores superiores para la temperatura de 5°C de almacenamiento para MIP y VE; sin embargo, con el sistema computarizado CASA los dos grupos se comparten de igual manera, pudiendo deberse a una cantidad mínima de pajuelas analizadas.
- III. Al analizar anomalías morfológicas se comportó de igual manera en ambos grupos.
- IV. Pero al análisis de HOST, fue la única prueba que acepta la propuesta planteada mostrando significación con diferencias superiores para una temperatura de 20°C.



6.2.- RECOMENDACIONES

Con los resultados obtenidos en la investigación, me permite realizar las siguientes recomendaciones:

- I. Almacenar y transportar por 6 horas a los testículos a 5°C con el fin de mantener una buena Motilidad Individual Progresiva, ya que mostrara mejores resultados antes de la crioconservación, y de igual forma en cuanto a las evaluaciones posdescongelación según el método de evaluación convencional.

- II. Proceder con más evaluaciones empleando el sistema Computer Assisted Semen Análisis (CASA), para obtener información más representativa y significativa por cuanto durante el trabajo investigativo y práctico se requirió de varias unidades experimentales.



7.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ablin, R. (1974). Immunologic properties of sex accessory tissue components. In Male Accessory Sex Organs. D. Brandes ed. New York, Academic Press.
- Aisen, E.G., Medina, V.H., Ventrino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- Albers, M. & Barrios, D. (2006). Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros *postmortem* obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Trop.*, 24(3):267-280. 2006.
- Amann, R.P., Hammerstedt, R.H., Veeramachaneni, D.N. (1993). The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 361-381.
- Amann, R. and Hammerstedt, R. (1980). Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biology of Reproduction*. 23: 647-656.
- Amann, R P, and Griel, LC, Jr. (1973). "Fertility of Bovine Spermatozoa from Rete Testis, Cauda Epididymidis, and Ejaculated Semen." *Journal of dairy science* 57(2): 212–219.
- Anel, L. (2003). "Effect of Epididymis Handling Conditions on the Quality of Ram Spermatozoa Recovered Post-Mortem." *Theriogenology* 60(7): 1249–1259.
- Avila-Portillo, L. M., Madero, J., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C. (2006). *Fundamentos de crio - preservacion*. Obtenido de <http://www.scielo.org>.
- Barbosa, L. M., Kanazawa, M, Y., Ribeiro-Peres, A., Ferreira de Souza, F. (2012). Viability of frozen semen obtained from epididymis of bulls post-mortem. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 19, n. 3, p. set./dez. 2012
- Barker, C. A. V. (1954). "Low Temperature Preservation of Bovine Epididymal Spermatozoa." *Canadian Journal of Comparative Medicine* 18(11): 390–393.
- 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 Industrial Animal, Valera 22 al 26 de Octubre, ULA Trujillo 2002.



- Barth, A.D, Oko, R.J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Ames, USA.
- Bedford, J.M., Hoskins, D.D. (1990). The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry, and physiology. Laming GE (ed). In: Marshall's Physiology of Reproduction. Churchill Livingston; London 1990: 379-568.
- Bredderman, P., Foote, R. (1969). Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. *J. Anim. Sci.* 28: 496-501.
- Brinsko, S., Crockett, E., Squires, E. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*; 54:129-136.
- Brogliatti, M. (2008). Inseminación artificial a tiempo fijo: el por qué de los intentos fallidos. Centro de Inseminación Artificial La Argentina Chica. 10: 22-25. www.produccion-animal.com.ar.
- Brooks, D.E. (1979). Biochemical environment of sperm maturation. *En* Fawcett D.W. y Bedford J.M. (Eds). *The Spermatozoon*. Baltimore_Munich: Urban and Schwarzenberg. pp 23-34.
- Bruemmer, J.E., Reger, H., Zibinski, G. & Squires, E.L. (2002). Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 58:405-407.
- Cavalcante, A. y Machado, L.A. (2012). *RECUPERAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE MAMÍFEROS*. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.6, n.1, p.1-8,
- Castelo, T.S., T Rodríguez, and Rodriguez, A. (2008). "Considerations on Goat Semen Cryopreservation." *Acta Veterinaria Brasilica* 2(3): 67–75.
- Cooper T.G. (1986). Epididymis, sperm maturation and fertilization. Springer-verlag; Berlin.
- Cosentino. M.J., Cockett, A.T. (1986). Structure and function of the epididymis. *Urol Res* 1986; 14: 229-240.



- semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador*". (Tesis de Maestría). Universidad de Cuenca.
- García-Álvarez, O. et al. 2009. "Heterologous in Vitro Fertilization Is a Good Procedure to Assess the Fertility of Thawed Ram Spermatozoa." *Theriogenology* 71(4): 643–650.
- Garde, J .J., Ortiz, N., García, A.J., and Gallego, L. (1998). "Postmortem Assessment of Sperm Characteristics of the Red Deer during the Breeding Season." *Archives of Andrology* 41: 195–202.
- Garner, D., Hafez, E. (1996). Espermatozoides y plasma seminal. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Editor E.S.E Hafez. Editorial Interamericana, Tercera edición. Capítulo 7: 158-179.
- González, J., Martínez, Y., Sánchez, D. (2013). ANÁLISIS SEMINAL EQUINO Y BOVINO. file://D:/Desktop/solo%20TESIS/tesis%2015/Espermatozoides%20in%20vitro,%20concentracion.htm
- Goodrowe, K.L. & Hay, M. (1993). Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 40:967-975.
- Graham, J.K., (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 239-247.
- Grijalva, J.E., Arevalo, V., Wood, C. H. (2004). Expansión y Trayectoria de la ganadería en la Amazonia, Ecuador. Estudio en el Valle de Quijos y Piedemonte en Selva alta. Instituto Nacional Autonomode Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Editorial, Tecnigrava. Primera edición, Enero 2004.
- Hafez, C. (1989). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5ta Ed. Interamericana Mc.Graw-Hill. México 694 pp
- Hafez, E. (1996). Espermatozoides y plasma seminal. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. 6° ed. McGRAW-HILL. México D. F. 7:172-173.
- Hafez, E.S.E., Hafez, B., (2000).Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. McGraw-Hill Interamericana. México (México). 2000.
- Hiipakka, R.A, Hammerstedt, R.H. (1978). Changes in 2-deoxyglucose transport during epididymal maturation of ram sperm. *Biol Reprod* 1978; 19: 1030-1035.



- Holt, W.V. (2000). "Basic Aspects of Frozen Storage of Semen." *Animal Reproduction Science* 62: 3–22.
- Holt, W.V., y Van Look, J.W. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*. 127: 527-535. 2004.
- Hoskins, D.D., Brandt, H., Acott, T.S. (1978). Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Fed Proc* 1978; 37: 2534-2542.
- Howard TH, Pace MM. (1998). Seminal evaluation and artificial insemination: Fertility and Infertility in Veterinary Practice. Laing JA, Morgan WJ, Wagner WC (eds). Bailliere Tindall. London (UK). 39-51.1998.
- James, A. N., Green, H., Hoffman, S., Landry, A. M., Paccamonti, D. & Godke, R.A. (2002). Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*. 58:401-404.
- Januskauskas, A., Zilinskas, H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Vet Zootec* 17, 1-8.
- Jeyendran, R., Vanderven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., ZaneveldL. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 47, 219-228.
- Jones, Roy. (2004). "Sperm Survival versus Degradation in the Mammalian Epididymis: A Hypothesis." *Biology of reproduction* 71(5): 1405–1411.
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraiez, P., Mann, T., Lutwak-Mann, C. (1981). *Male Reproductive Function and Semen*. New York, Springer-Verlag.
- König, H.E., Liebich, H-G. (2008). *Anatomía de los animals domésticos. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Texto y atlas de color. Glándulas genitales accesorias. Tomo II*. Editorial Médica Panamericana S.A. Pg, 129-130
- Licht, P. (1984). Reptiles. In: Lamming GE (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone; London 1984: 206-282.



- López, M.J., Urbano, A., Cárdenas, M. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen. Estudio Básico Del Espermiograma. 1ª edición © 2012 OmniaScience (Omnia Publisher SL)
- Martins, C.F., Driessen, K., Melo Costa, P., Carvalho-Neto, J.O., de Sousa, R.V., Rumpf, R., Dode, M.N. (2009). "Recovery, Cryopreservation and Fertilization Potential of Bovine Spermatozoa Obtained from Epididymides Stored at 5 Degrees C by Different Periods of Time." *Animal reproduction science* 116(1-2): 50–57.
- Martins, C F., Rumpf, R., Pereira, D C., and Dode, M N. (2007). "Cryopreservation of Epididymal Bovine Spermatozoa from Dead Animals and Its Uses in Vitro Embryo Production." *Animal reproduction science* 101: 326–331.
- Monteiro, G a et al. 2011. "Cryopreservation and Fertility of Ejaculated and Epididymal Stallion Sperm." *Animal reproduction science* 127(3-4): 197–201.
- Mota, Antonio, and Lúcia Machado da Silva. (2012). "RECUPERAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES." *Acta Veterinaria Brasilica* 6(1): 1–8.
- Moore, H.D.M., Akhondi, M.A. (1996). In vitro maturation of mammalian spermatozoa. *Rev Reprod* 1996; 1: 54-60.
- Muñoz, R., Fernández, M., Peña, A.I. (2006). Parámetros cinéticos de eyaculados bovinos de toros de raza Frisona y Rubia Gallega. *ITEA: Información Técnica Económica Agraria*. 102: 55-66.
- Muradás, P.R, Weiss, R.R, Kozicki, L.E., Granemann, L.C, Santos, I.W., Pimpão, C.T. (2006). Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing. *Arch Vet Sci*. 2006; 11(3): 69-74.
- Oliva S. U., Rinaldo P. A & Stumpp T. (2009). Biología epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. *O Mundo da Saúde*. 33:419-425.
- De Pauw, Ingrid. (2003). "Bovine Semen Preservation under Epididymal Conditions and Assessment of Sperm Quality by Means of a Sperm- Oviduct Binding Assay." *Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde*.
- Pérez-Llano, B., González, J.L., Clemente, M.G., García-Casado, P. (1999). El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albéitar* 30: 16-17.



- Pickett, B. (1975). Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil steril*; 26:167-174.
- Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén, J., González, D., Palomares, R., Madrid-Bury, N. (2007). Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de toros. XI Jornadas Nacionales de la Facultad experimental de Ciencias-LUZ. 12-15/10/07. Maracaibo, Venezuela. 128.
- Quintero-Moreno, A., Rigaut, T. and Rodríguez-Gil, J.E. (2007 B). Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 312-319.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, Ml., Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch Med Vet* 46, 31-38.
- Rubio-Guillén, J., González, D., Quintero, A. (2006A). El test de hinchamiento osmótico: un test de gran utilidad para medir la función espermática en semen de toro. *Con Tacto Veterinario FCV-LUZ*. 6 (11): 11-12.
- Rubio-Guillén, J. (2006). Efecto del proceso de criopreservación sobre la calidad seminal y fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. Universidad del Zulia. Facultad de Cs. Veterinarias. (Tesis de Maestría). Maracaibo, Venezuela. 103.
- Rubio-Guillén, J., Quintero-Moreno, A., y González, D. (2009). Effect of Cryopreservation on Integrity of Plasmatic and Acrosomal Membrane of Bulls Sperm. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIX, Nº 4, 382 - 389, 2009.*
- Setchell, B.P. (1998). The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil.* 114:179-94.
- Shivaji, S., Bharagava, P., Scheit, K. (1984). Immunological identification of seminalplasmin in tissue extracts of sex glands of bull. *Biology of Reproduction*, 30:1237-1241.
- Stout, M. (2012). "Comparison of Epididymal and Ejaculated sperm Collected from the Same Holstein Bulls." Universidad de Louisiana



- Lafayette. Tiplady, C.A., Morris, L.H.A & Allen, W.R. (2002). Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*. 58:225-228.
- Tittarelli, C., Savignone, C.A., Arnaudín, E., Stornelli, M.C., Stornelli, M.A., de la Sota, R.L. (2006). Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, v.66, n.6, p.1637-40. doi:10.1016/j.theriogenology. 2006.01.021.
- Turri, F., Madeddu, M., Gliozzi, TM., Gandini, G., and Pizzi, F. (2011). "Influence of Recovery Methods and Extenders on Bull Epididymal Spermatozoa Quality." *Reproduction in domestic animals*. ISSN 0936-6768.
- Van der Ven, H.H., Jeyendran, R.S., Al-Hasani, S., Pérez-Peláez, M., Diedrich, K., Zaneveld, L.J.. (1986). Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic médium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization. *J Androl* 7: 190-196.
- Vera, O. (2001). Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción Bovina*. C. González- Stagnaro (Ed). Fundación Girarz. Edic. Astro Data S. A. Maracaibo-Venezuela. Cap: XII: 1 – 11.
- Verstegen, J. and Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57: 149- 179.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci*. 60: 481-492. 2000.
- Weiss, R.R., Muradas, P.R., Graneman, L.C., and Meira, C. (2008). "Freezing Sperm from Cauda Epididymis of Castrated Stallions." *Animal Reproduction Science* 107(3): 356.
- White, I. (1980). Secretion of male reproductive tract and seminal plasm. In *Reproductive in farm Animals*. 4th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger.
- Zhu, W., Liu, X. (2000). Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. *Asian J Androl* 2: 135-138.



ANEXOS



Anexo 1. ADEVA de la variable MIP para espermatozoides recuperados.

MIP para espermatozoides recuperados	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	833,3	1	833,3	5,35	0,043 *
Dentro de grupos	1558,3	10	155,8		
Total	2391,7	11			

* Existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$)



Anexo 2. ADEVA para Variables de viabilidad espermática pos-descongelación.

Variables		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Motilidad Individual Progresiva (MIP)	Entre grupos	1394,1	1	1394,1	6,77	0,012 *
	Dentro de grupos	11530,5	56	205,9		
	Total	12924,6	57			
Vitalidad Espermática (VE)	Entre grupos	1249,0	1	1249,0	5,26	0,026 *
	Dentro de grupos	13299,9	56	237,5		
	Total	14548,9	57			
Anormalidades morfológicas	Entre grupos	63,3	1	63,3	0,61	0,437 NS
	Dentro de grupos	5776,3	56	103,1		
	Total	5839,6	57			
Endósmosis membrana (HOST)	Entre grupos	1049,4	1	1049,4	6,21	0,016 *
	Dentro de grupos	9457,9	56	168,9		
	Total	10507,4	57			

* Existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$)
 NS expresa, no significativo



Anexo 3. MANOVA de la viabilidad espermática pos-descongelación y según los dos grupos de temperatura en estudio.

	Efecto	Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.
Interceptación	Traza de Pillai	,97	377,301 ^b	4,00	53,00	,000
	Lambda de Wilks	,03	377,301 ^b	4,00	53,00	,000
	Traza de Hotelling	28,48	377,301 ^b	4,00	53,00	,000
	Raíz mayor de Roy	28,48	377,301 ^b	4,00	53,00	,000
TEMP_MIP_DESCO	Traza de Pillai	,27	4,910 ^b	4,00	53,00	,002
	Lambda de Wilks	,73	4,910 ^b	4,00	53,00	,002
	Traza de Hotelling	,37	4,910 ^b	4,00	53,00	,002
	Raíz mayor de Roy	,37	4,910 ^b	4,00	53,00	,002

a. Diseño : Interceptación + TEMP_MIP_DESCO
b. Estadístico exacto

Anexo 4. ADEVA para Variables de viabilidad espermática pos-descongelación según el sistema CASA.

Variables analizadas según el sistema CASA		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Motilidad Total CASA	Entre grupos	107,3	1	107,3	,251	0,634^{NS}
	Dentro de grupos	2562,6	6	427,1		
	Total	2669,9	7			
Motilidad Individual Progresiva CASA	Entre grupos	22,7	1	22,7	,108	0,754^{NS}
	Dentro de grupos	1264,2	6	210,7		
	Total	1287,0	7			
Motilidad Local CASA	Entre grupos	31,2	1	31,2	,610	0,464^{NS}
	Dentro de grupos	306,4	6	51,1		
	Total	337,6	7			
Espermatozoides Inmóviles CASA	Entre grupos	107,3	1	107,3	,251	0,634^{NS}
	Dentro de grupos	2562,6	6	427,1		
	Total	2669,9	7			
Anormalidades CASA	Entre grupos	28,1	1	28,1	,503	0,505^{NS}
	Dentro de grupos	335,8	6	56,0		
	Total	363,9	7			
NS expresa, no significativo						

Anexo 5. Fotografías de los materiales y de los trabajos de campo.



Materiales utilizados en el campo.



Testículos de toros provenientes de matadero.

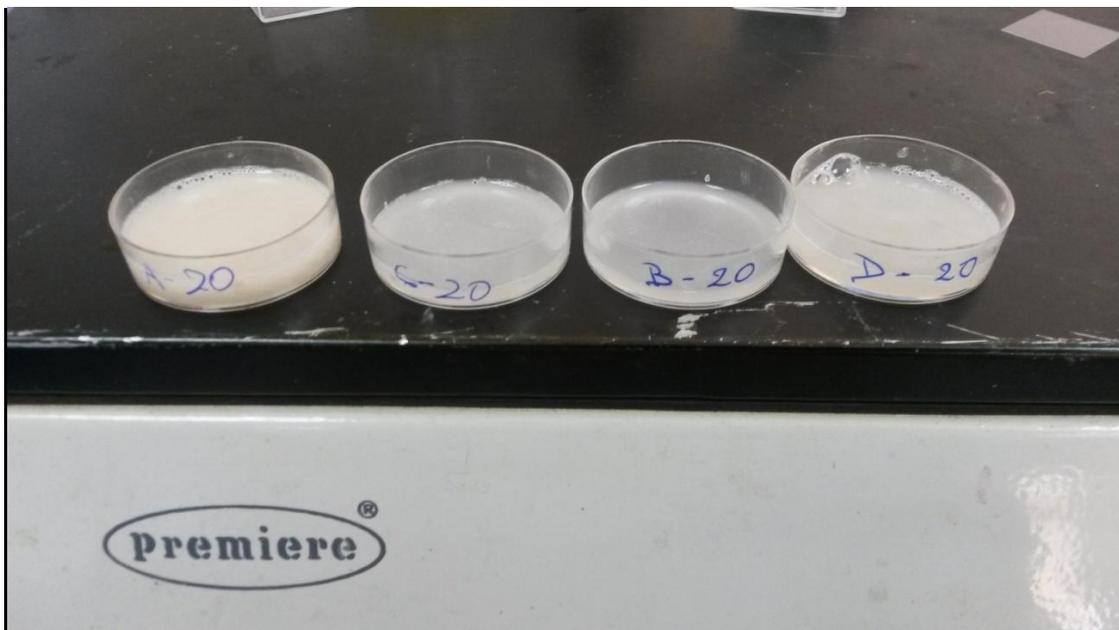


Testículos de los toros listos para el empaquetado con su identificación respectiva.

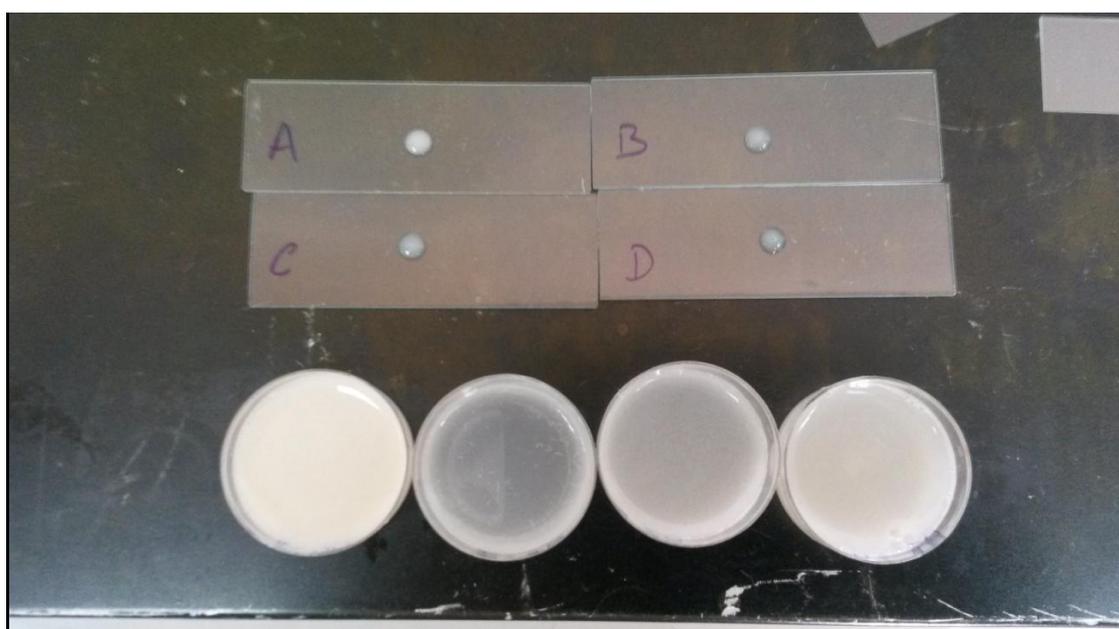


Las cajas con su temperatura de 5 °C y 20 °C para el almacenamiento y transporte de los Testículos de los toros.

Anexo 6. Fotografías de trabajos realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la Granja Irquis de la Universidad de Cuenca.



Recuperación del espermatozoides de un grupo de testículos conservados a 20 °C y colocados en una platina térmica.



Placas listas para las evaluaciones de las muestras post recuperación.



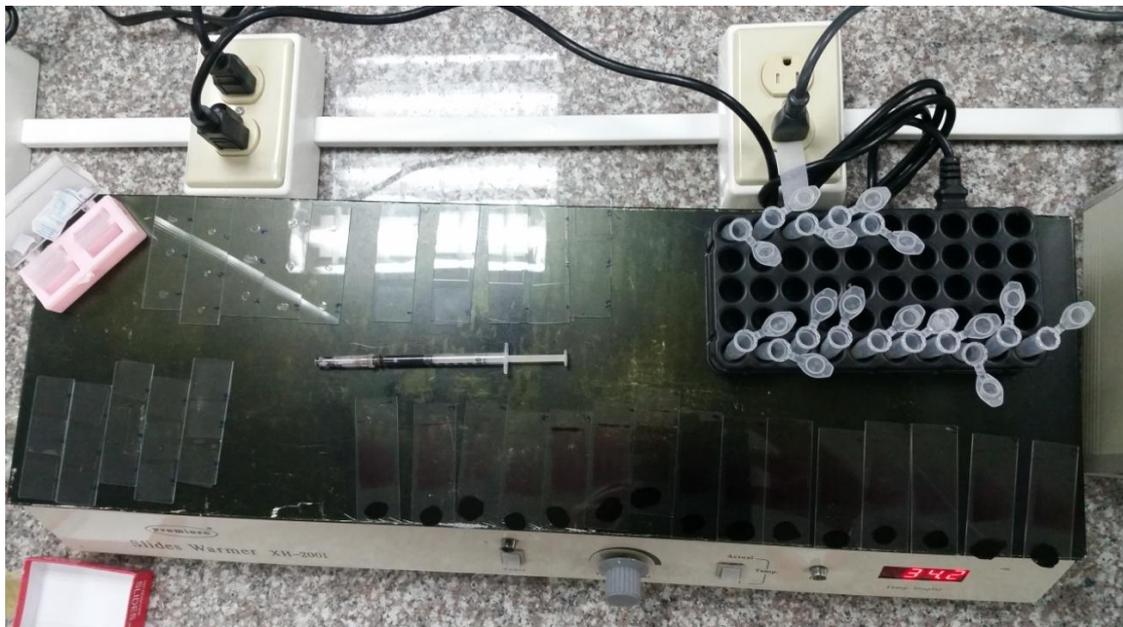
Cámara de flotación para crioconservación en nitrógeno líquido lista para crioconservar las pajuelas obtenidas en el proyecto.



Cámara de flotación de crioconservación en nitrógeno líquido en el momento de retiro de las pajuelas obtenidas en el proyecto.



Pajuelas que se utilizaron para su evaluación, post-crioconservadas.

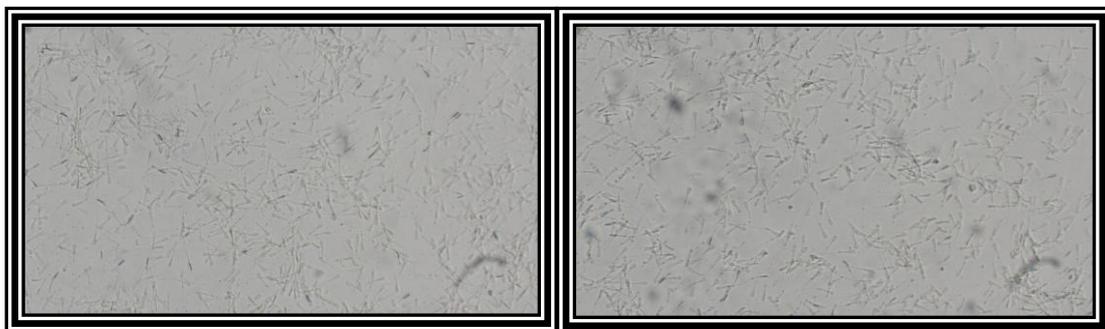


Placa térmica con muestras que han sido evaluadas postcrioconservadas.

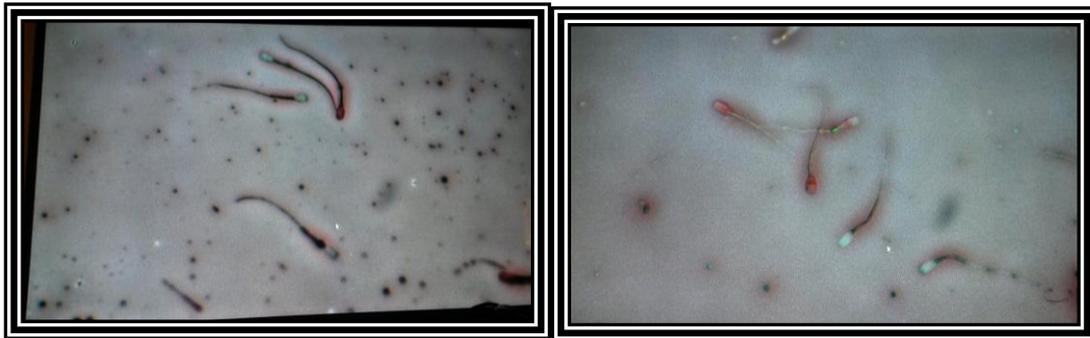


Evaluaciones de las muestras postcrioconservadas.

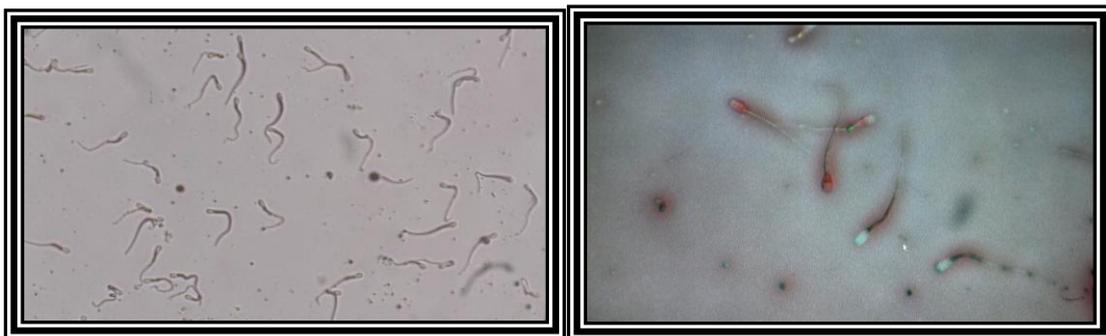
Anexo 7. Fotografías de Motilidad espermática individual progresiva con el método convencional.



Anexo 8. Fotografías de Vitalidad espermática con el método convencional.



Anexo 9. Fotografías de Anomalías espermáticas con el método convencional.



Anexo 10. Fotografías del Test de "HOST".





Anexo 11. Fotografías del equipo del sistema “CASA” y de su evaluación.

