



Artículo original / Original article

Evaluación de la sobrevivencia y fertilidad *in vivo* de espermatozoides del epidídimo de toros criollos *post mortem*

Evaluation of survival and *in vivo* fertility epididymal sperm of Creole Bulls *post mortem*

Manuel Guido Pérez-Durand ¹ ; Natalio Luque-Mamani ¹ ; Abel Eleazar Quispe-Quispe ¹ ; Eloy Amador Condori-Chuchi ¹ ; Francisco Halley Rodríguez-Huanca ¹ ; Yan Pierr Manrique-Quispe ^{2*} ; Uri Harold Perez-Guerra ¹

¹Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

²Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, Puerto Maldonado, Perú

Recibido: 10/04/2022

Aceptado: 29/06/2022

Publicado: 25/07/2022

*Autor de correspondencia: ymanrique@unamad.edu.pe

Resumen: El objetivo del presente estudio fue determinar la sobrevivencia *in vitro* y la fertilidad *in vivo* de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de toros criollos *post mortem*. Se colectaron 18 pares de testículos de toros criollos adultos del camal municipal El Collao-Ilave, posterior a su sacrificio. Cada par de testículos fueron transportados al laboratorio y almacenados aleatoriamente en refrigeración a 5°C durante 0 (n=6), 12(n=6) y 24(n=6) h. Al final de cada periodo, los espermatozoides fueron colectados y evaluados antes de la congelación y después de la descongelación en motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad de acrosoma, congelados con dilutor Tris-yema de huevo (10%)-glicerol (7%) en pajillas de 0,25 mL con 30x10⁶ espermatozoides motiles/pajilla. La prueba de fertilidad *in vivo* se realizó en 13 vacas, evidenciando que las características espermáticas evaluadas se preservaron antes de la congelación, pero a la descongelación fueron afectados por efecto de la refrigeración. Producto del proceso de la congelación y los espermatozoides congelados-descongelados, tuvieron capacidad de fertilizar. Por tanto, los espermatozoides colectados son congelables y pueden aplicarse en técnicas reproductivas asistidas.

Palabras clave: espermatozoide; epidídimo; fertilidad; inseminación artificial

Abstract: The objective of this study was to determine the *in vitro* survival and *in vivo* fertility of spermatozoa recovered from the tail of the epididymis of Creole bulls *post mortem*. Eighteen pairs of testicles from adult Creole bulls from the El Collao-Ilave Municipal slaughterhouse were collected after their sacrifice. Each pair of testes were transported to the laboratory and randomly stored refrigerated at 5°C for 0(n=6), 12(n=6) and 24(n=6) h. At the end of each period, spermatozoa were collected and evaluated before freezing and after thawing for total motility, progressive motility, hyposmotic test, and acrosome integrity, frozen with Tris-yolk (10%)-glycerol diluter (7%) in 0.25 mL straws with 30x10⁶ motile spermatozoa/straw. The *in vivo* fertility test was performed on 13 cows, evidencing that the evaluated sperm characteristics were preserved before freezing, but upon thawing they were affected by the effect of refrigeration. Product of the freezing process and the frozen-thawed spermatozoa had the capacity to fertilize. Therefore, the collected spermatozoa can be frozen and can be applied in assisted reproductive techniques

Keywords: spermatozoon; epididymis; fertility; artificial insemination

1. Introducción

La cola del epidídimo es uno de los principales lugares de almacenamiento de espermatozoides antes de la eyaculación, cuyo ambiente provee una condición ideal para la supervivencia espermática. Así, espermatozoides almacenados dentro de esta estructura retienen su motilidad y su capacidad fertilizante (White, 1933; Soler et al., 2005; Martins et al., 2009). La cola del epidídimo es capaz de almacenar un número suficiente de espermatozoides para varias eyaculaciones, lo que determina que este lugar sea una fuente de germoplasma aún poco explorada comercialmente en el toro (Ribeiro-Peres et al., 2014).

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

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

2. Materiales y métodos

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que se encuentra ubicado a una altitud de 3820 msnm. Se colectaron 18 pares de testículos de toros criollos adultos del camal Municipal de la Provincia del Collao-Ilave, durante los meses de agosto a diciembre del 2013. Una vez transportado al laboratorio cada par de testículos fueron almacenados en refrigeración a 5°C de forma aleatorio durante 0 h (n=6), 12 h (n=6) y 24 h (n=6) respectivamente.

2.1. Colección y Transporte de los Testículos

Los testículos se colectaron con su escroto respectivo, de toros criollos adultos, inmediatamente después del sacrificio. Los complejos escroto-testículos-epidídimos fueron identificados y colocados dentro de una caja de tecnopor para su transporte hacia el laboratorio. El transporte duró aproximadamente entre 2 h a 4 h.

2.2. Colección de Espermatozoides del Epidídimo

Al final de cada periodo de refrigeración se realizó la colección de los espermatozoides de la cola del epidídimo mediante el método descrito por Martins et al. (2009), con ciertas modificaciones; En primer lugar, se procedió a diseccionar y separar la región de la cola del epidídimo de la región del cuerpo del epidídimo y del conducto deferente. Una vez separada la cola del epidídimo se realizó la fijación del mismo por su borde de inserción con la ayuda de una pinza hemostática tipo mosquito. Luego se realizó 2 a 3 incisiones en el borde libre de la cola del epidídimo con la ayuda de un bisturí con hoja N° 22 y raspando suavemente en las superficies de los cortes realizados se dejan caer 2 a 3 gotas de contenido epididimal en un tubo de ensayo de 15 ml que contenía 2 ml de dilutor Tris-yema de huevo precalentado a 35°C.

2.3. Evaluación de Espermatozoides Epididimarios

Las muestras de espermatozoides fueron evaluadas en concentración, vitalidad, morfología, motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico (HOST) e integridad de acrosoma. La evaluación de la concentración se realizó mediante el método de Hemocitómetro. La vitalidad y morfología espermática se realizó mediante el uso de la tinción de Eosina-Nigrosina. La evaluación de la motilidad total y motilidad progresiva se realizaron a 37°C con un aumento de 200 a 400X. La evaluación de HOST se realizó por el método descrito por Jeyendran et al. (1984) con ciertas modificaciones a un aumento de 400X. La evaluación de la integridad de acrosoma se realizó mediante el método descrito por Awad & Graham (2004), con ciertas modificaciones a un aumento de 1000X siendo de la misma forma durante la descongelación de semen. Todas las evaluaciones microscópicas fueron realizadas en un microscopio de contraste de fases LEICA DM750.

2.4. Congelación de Espermatozoides Epididimarios de Toros Criollos *post mortem*

Las muestras espermáticas fueron diluidas con Tris – yema de huevo (10%) – glicerol (7%) y enfriada en forma gradual y lentamente de 35°C hasta 5°C por un periodo de 5 h. Las muestras de espermatozoides fueron envasadas en pajillas de 0,25 ml con una concentración total de 30x10⁶ espermatozoides y equilibradas por 1 h. La congelación fue realizada en vapores de nitrógeno líquido (NL) a 4 cm sobre el nivel de NL por 10 min, finalmente fueron sumergidas directamente en el NL a -196°C y almacenadas en el termo criogénico hasta su evaluación y/o uso en inseminación artificial. La descongelación se realizó en Baño María a una temperatura de 37°C por un periodo de 45 s.

2.5. Prueba de Fertilidad *in vivo* de espermatozoides del epidídimo de toros *post mortem*

Para determinar la prueba de fertilidad *in vivo* se realizó mediante la inseminación artificial de 13 vacas Brown Swiss del Centro de Investigación y Producción (CIP) de Chuquibambilla durante los meses de junio a agosto del 2014, con muestras espermáticas obtenidas del epidídimo de un toro criollo *post mortem* que correspondía al periodo de refrigeración de hora 0 (0 h), con una concentración de 50 x 10⁶ espermatozoides/pajilla. La fertilidad "*in vivo*" de espermatozoides del epidídimo post descongelados se determinó mediante evaluación ecográfica entre los días 30 – 35 post inseminación.

2.6. Análisis Estadístico

Para determinar el efecto de los diferentes periodos de refrigeración (0, 12 y 24 h) de los epidídimos a 5°C sobre la motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad de acrosoma antes de la congelación y después de la descongelación fueron evaluados mediante el Análisis de Variancia (ANVA) bajo un Diseño Completamente Aleatorio, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Las medias de los tratamientos fueron comparadas con el uso de la Prueba de Tukey. Se usó el software estadístico de S.A.S. (Versión 9.2). Para determinar el efecto del proceso de la congelación-descongelación sobre la Motilidad Total, Motilidad Individual, Test Hiposmótico e Integridad de Acrosoma fueron evaluados mediante el estadístico de Ji-cuadrada, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

3.1. Motilidad Total y Progresiva

Los resultados en motilidad total y progresiva se muestran en la Tabla 01, donde a la evaluación antes de la congelación no fue afectada por efecto de la refrigeración de los epidídimos a 5°C por 0, 12 y 24 h ($p > 0,05$), pero a la descongelación si fue afectada tanto por el efecto de la refrigeración ($p \leq 0,05$) y como por el efecto de la congelación-descongelación ($p \leq 0,05$).

3.2. Test hiposmótico (HOST)

Los resultados en test hiposmótico se muestran en la Tabla 01, donde a la evaluación antes de la congelación no fue afectada por efecto de la refrigeración de los epidídimos a 5°C por 0, 12 y 24 h ($p>0,05$) pero a la descongelación sí fue afectada por el efecto de la refrigeración de los epidídimos ($p\leq 0,05$). En cambio, el proceso de la congelación - descongelación no afectó en el periodo de refrigeración a 0 h ($p>0,05$); sin embargo, sí afectó en los periodos de refrigeración a 12 y 24 h ($p\leq 0,05$).

3.3. Integridad de Acrosoma

Los resultados en integridad de acrosoma se muestran en la Tabla 01, donde a la evaluación antes de la congelación no fue afectada por efecto de la refrigeración de los epidídimos a 5°C por 0, 12 y 24 h ($p>0,05$) pero a la descongelación sí fue afectada por el efecto de la refrigeración de los epidídimos ($p\leq 0,05$). En cambio, el proceso de la congelación - descongelación no afectó en el periodo de refrigeración a 0h ($p>0,05$); sin embargo, sí afectó en los periodos de refrigeración a 12 y 24 h ($p\leq 0,05$).

3.4. Prueba de fertilidad *in vivo* de espermatozoides de toros criollos *post mortem*

Mediante el diagnóstico ecográfico entre los días 30 - 35 *post inseminación*, se encontró una fertilidad del 69,2% (9/13).

Tabla 1. Características espermáticas de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros criollos *post mortem*.

	Tiempo de refrigeración a 5°C		
	0h (n=6)	12h (n=6)	24h (n=6)
Antes de la congelación			
Motilidad Total (%)	80,06 ± 11,68	74,43 ± 10,78	70,25 ± 14,47
Motilidad Progresiva (%)	44,76 ± 10,31	37,41 ± 12,20	30,97 ± 9,75
Test Hiposmótico (%)	69,72 ± 7,20	67,87 ± 4,46	60,31 ± 7,91
Acrosoma Intacto (%)	62,18 ± 7,66	64,83 ± 3,69	59,51 ± 7,13
Después de la descongelación			
Motilidad Total (%)	49,26 ± 15,68 ^a	26,41 ± 6,82 ^b	24,92 ± 4,89 ^b
Motilidad Progresiva (%)	19,57 ± 5,18 ^a	12,55 ± 4,25 ^b	11,19 ± 2,72 ^b
Test Hiposmótico (%)	53,21 ± 5,53 ^a	31,99 ± 6,87 ^b	27,47 ± 4,86 ^b
Acrosoma Intacto (%)	48,33 ± 4,45 ^a	28,90 ± 7,25 ^b	23,87 ± 6,95 ^b

Nota: Letras superpuestas diferentes indican diferencias ($p\leq 0,05$) entre periodos de refrigeración.

4. Discusión

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

En cambio, a la descongelación se encontró que las características espermáticas evaluadas fueron afectadas drásticamente por el proceso de la congelación-descongelación y conforme aumentaba

el periodo de refrigeración, aunque a la descongelación en el periodo de refrigeración a 0 h se encontró tasas espermáticas aceptables en el HOST. Sin embargo, en los espermatozoides de epidídimos refrigerados a 5°C por 12 y 24 h se encontraron menores tasa de recuperación en todas las características evaluadas a la descongelación, esto debido posiblemente a que los espermatozoides refrigerados sufren más daños por efecto de la congelación y descongelación (Martins et al., 2009). En contraste con los resultados del presente trabajo, se ha reportado que una alta proporción de espermatozoides pierden su motilidad u otras funciones después de la descongelación debido al daño durante el proceso de la congelación-descongelación y la recuperación de la motilidad espermática es menor que 50% en la mayoría de los mamíferos. Con respecto a las causas que produce el daño espermático por el proceso de la congelación-descongelación existen varias hipótesis como shock por frío, estrés osmótico, formación de cristales de hielo y por daño oxidativo (Watson, 2000).

El resultado obtenido en fertilidad *in vivo* (69,2%), con la consiguiente obtención de 4 crías sanas, muestra uno de los primeros reportes de fertilidad mediante la inseminación artificial con espermatozoides congelados (-196°C) obtenidos de la cola del epidídimo de un toro muerto. Este resultado es mayor a lo reportado por Costa et al. (2011) quienes encontraron una tasa de gestación del 20% con el nacimiento de 2 crías. Resultados similares fueron publicados en otros rumiantes, así como en ovinos por Ehling et al. (2006) encontraron una tasa de parición del 87,5% inseminadas con semen de epidídimo congelado-descongelado.

Por otro lado, en ciervos por Soler et al. (2005), realizaron la inseminación intrauterina de 66 hembras usando muestras espermáticas epididimarios de 3 machos encontrando una fertilidad total del 56,0%. Así mismo, en esta misma especie Garde et al. (1998) encontraron 23,5% de crías logradas (4/17). Estos resultados muestran que este método de conservación de semen es eficiente y asociado con altas tasas de fertilidad.



Figura 1. Terneras nacidas procedentes del semen de epidídimo de toros *post mortem*

5. Conclusiones

La refrigeración de los epidídimos a 5°C preservó por 24 h todas las características espermáticas evaluadas antes de la congelación; sin embargo, a la descongelación fue afectada tanto por el proceso de la congelación-descongelación, así como por el efecto de la refrigeración de los epidídimos. Encontrándose mejores resultados en el periodo de refrigeración de 0 h. Los espermatozoides congelados-descongelados obtenidos del epidídimo de toros *post mortem* tienen la capacidad de fertilización y obtener descendencia satisfactoriamente.

Financiamiento

Ninguno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de autores

Q-Q, A. E.: Preparación y ejecución.

P-G, U. H.: Preparación, ejecución y supervisión del estudio.

P-D, M. G.: Desarrollo de la metodología, supervisión, concepción y diseño del estudio.

R-H, F. H.: Desarrollo de la metodología y edición del artículo.

L-M, N.: Concepción y diseño.

C-C, E. A. y M-Q, Y. P.: Edición del artículo.

Referencias bibliográficas

- An, T. Z., Wada, S., Edashige, K., Sakurai, T., & Kasai, M. (1999). Viable Spermatozoa Can Be Recovered from Refrigerated Mice up to 7 Days after Death. *Cryobiology*, *38*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2141>
- Awad, M. M., & Graham, J. K. (2004). A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the cold surface of cattle fat. *Animal Reproduction Science*, *84*(1–2), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.001>
- Costa, P. de M., Martins, C. F., Franco, V. de O., Rezende, L. O. F., Sereno, J. R. B., & Campos, H. da C. F. (2011). Nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozoides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. *Ciência Rural*, *41*(5), 869–874. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000045>
- Ehling, C., Rath, D., Struckmann, C., Frenzel, A., Schindler, L., & Niemann, H. (2006). Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology*, *66*(9), 2160–2164. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.003>
- Garde, J., Ortiz, N., García, A., López, A., & Gallego, L. (1998). Cryopreservation of sperm samples collected post mortem and Artificial Insemination in Iberian Deer. *Arch. Zootec*, *47*, 351–356.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, *70*(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Rouissi, H., Herraiez, P., & Anel, L. (2003). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, *60*(7), 1249–1259. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00139-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00139-0)
- Kishikawa, H., Tateno, H., & Yanagimachi, R. (1999). Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 C. *Reproduction*, *116*(2), 217–222. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160217>

- Martins, C. F., Driessen, K., Costa, P. M., 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°C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*, 116(1-2), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.12.018>
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31-38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Soler, A. J., Estes, M. C., Fernández-Santos, M. R., & Garde, J. J. (2005). Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymis for several days. *Theriogenology*, 64(7), 1503-1517. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.013>
- Songsasen, N., Tong, J., & Leibo, S. P. (1998). Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *The Journal of Experimental Zoology*, 280(2), 189-196. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980201\)280:2<189::AID-JEZ10>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980201)280:2<189::AID-JEZ10>3.0.CO;2-H)
- Watson, P. . (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- White, W. E. (1933). The duration of fertility and the histological changes in the reproductive organs after ligation of the vasa efferentia in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 113(785), 544-550. <https://doi.org/10.1098/rspb.1933.0066>
- Yu, I., & Leibo, S. P. (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*, 57(3), 1179-1190. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00711-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00711-7)