

# CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OBTENIDO DEL EPIDÍDIMO VS CONDUCTO DEFERENTE DE BOVINOS *POST-MORTEM*: RESULTADOS PRELIMINARES

CRYOPRESERVATION OF SEMEN OBTAINED FROM EPIDIDYMISS VERSUS VAS DEFERENS OF *POST-MORTEM* BULLS: PRELIMINARY RESULTS

Olivo-Zepeda I.B.<sup>1\*</sup>, Flores-Padilla J.P.<sup>2</sup>, Núñez-Anita R.E.<sup>1</sup>,  
Val-Arreola D.<sup>2</sup>, Toscano-Torres I.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal, México. \*ozib7@hotmail.com.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

---

**Keywords:** Freezing; Sperm; Testicles; Bull; Viability.

**Palabras Clave:** Congelación; Espermatozoides; Testículos; Toro; Viabilidad.

---

## ABSTRACT

Cryopreservation of post-mortem sperm has potential as an effective tool to preserve the genetic material of endangered species or native species, as well as animals of highly productive value that die unexpectedly. The aim of this study was to cryopreserve bovine spermatozoa obtained post-mortem from the epididymis vs. vas deferens from dead bulls. A total of 10 intact testicles were collected from slaughtered bulls. Spermatozoa were obtained from the epididymis (EE) and vas deferens (VDE) using the retrograde flow technique. The recovered sperm were diluted using a commercial extender (Triladyl®). Progressive Motility (PM), Viability (V) and Abnormal Morphology (AM) rates were evaluated. The spermatozoa were then frozen by the conventional method, using a concentration of  $50 \times 10^6$  spermatozoa per dose. Later the doses were thawed at 37°C in a water bath for one minute to consecutively evaluate the PM and V. Preliminary results were analyzed using a generalized linear model considering the treatments as fixed effect, the differences between means were evaluated using the technique of significant minimum differences. For fresh EE and VDE the mean PM was  $71.7 \pm 2.6$  and  $75.0 \pm 4.5$ ; The V was  $68.7 \pm 4.84$  and  $79.2 \pm 5.6$ ; The AM was  $57.27 \pm 5.9$  and  $42.33 \pm 6.02$ , respectively. For the EE and VDE after freezing, the observed PM was  $41.0 \pm 7.04$  and  $55.7 \pm 8.71$  for EE and VDE, respectively. These data, although preliminary, indicate that there are no significant differences between the spermatozoa extracted from the vas deferens and the tail of the epididymis with respect to the percentage of PM and V post-freeze. However, in fresh and post-freeze semen obtained from the tail of the epididymis and the vas deferens, if there are differences in the percentage of AM being higher in the EE; with respect to the percentage of V, this parameter was higher for ECD.

---

## RESUMEN

La criopreservación de espermatozoides obtenidos post-mortem parece ser una herramienta eficaz para conservar el material genético de especies en peligro de extinción, especies autóctonas o nativas, así como de animales de alto valor zootécnico, que mueran inesperadamente. El objetivo

del presente trabajo es criopreservar espermatozoides de bovino obtenidos de la cola del epidídimo (CE) vs conducto deferente (CD) de toros post-mortem. Se colectaron un total de 10 testículos intactos provenientes de animales de rastro. Los espermatozoides se obtuvieron de la CE y CD utilizando la técnica de flujo retrógrado. Los espermatozoides recuperados se mantuvieron en un diluyente comercial (Triladyl®). Se evaluó la Motilidad Progresiva (MP), Viabilidad (V) y Morfología Anormal (MA). Posteriormente se congelaron por el método convencional, utilizando una concentración de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides por dosis. Las dosis se descongelaron a  $37^\circ\text{C}$  en baño María durante un minuto para consecutivamente evaluar la MP y V. Los resultados preliminares se analizaron empleando un modelo lineal generalizado considerando a los tratamientos como efecto fijo, las diferencias entre medias se evaluaron empleando la técnica de diferencias mínimas significativas. Para los espermatozoides de la CE y CD frescos el promedio de MP fue de  $71.7 \pm 2.6$  y  $75.0 \pm 4.5$ ; la V fue de  $68.7 \pm 4.84$  y  $79.2 \pm 5.6$ ; la MA fue de  $57.27 \pm 5.9$  y  $42.33 \pm 6.02$ , respectivamente. Para los espermatozoides de la CE y CD post-descongelación, la MP observada fue de  $41.0 \pm 7.04$  y  $55.7 \pm 8.71$  respectivamente. Estos datos, aunque son preliminares, indican que no existen diferencias significativas entre los espermatozoides extraídos de la CE y CD, respecto a la tasa de MP y V post-descongelación. Sin embargo, en el semen fresco y post-descongelación obtenido de la CE y del CD, si hay diferencias en la tasa de MA siendo mayor en los espermatozoides de la CE; respecto a la tasa de V, este parámetro resultó mayor para los espermatozoides del CD.

---

## INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo (CE) y conducto deferente (CD) de animales post-mortem han evidenciado sobrevivencia. En especies domésticas y silvestres existe información sobre recuperación y criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo. En caninos se han recuperado espermatozoides viables de epidídimo dentro de las 24 horas post-mortem, ya que después de este período va disminuyendo la calidad de los espermatozoides y dejan de ser aptos para el proceso de criopreservación (González *et al.*, 2013); en ovinos también se han recuperado espermatozoides dentro de las 24 horas post-mortem con características similares a los espermatozoides eyaculados y se han criopreservado con éxito (Kaabi *et al.*, 2003); en la especie bovina los espermatozoides recuperados del epidídimo se han utilizado para producción de embriones *in vitro*, con tasas de fertilización  $\geq$  al 80 % (Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2007); en especies silvestres como el venado sica se han recuperado espermatozoides post-mortem del epidídimo y se han sometido al proceso de criopreservación con buenos resultados (58.1 % de motilidad y 83.2 % de viabilidad), lo que sugiere que podrían ser utilizados para técnicas de reproducción asistida (Hishinuma *et al.*, 2003). Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre la colecta, criopreservación y/o inseminación artificial (IA) utilizando espermatozoides procedentes del CD, sabiendo que en algunas circunstancias esta podría ser la última opción para la conservación del germoplasma. Por tal motivo, es transcendental realizar estudios sobre la criopreservación de espermatozoides extraídos tanto de la CE como del CD, evaluando sus características morfológicas y funcionales las cuales son necesarias para la fertilización. La criopreservación de semen asociada con la IA representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético (Ribeiro *et al.*, 2014). Cuando un animal muere inesperadamente, su material genético se pierde, para evitar esto, una alternativa para preservar el germoplasma de estos animales es la extracción de los espermatozoides del epidídimo (Martins *et al.*, 2007). Este procedimiento post-mortem es considerado una importante herramienta para el uso de espermatozoides del epidídimo, y existen

varios protocolos de criopreservación de espermatozoides, muchos de ellos aún son experimentales y en su mayoría están dirigidos a preservar el germoplasma de especies que están en peligro de extinción. Los espermatozoides extraídos del epidídimo o CD pueden ser criopreservados o utilizados de inmediato en la fertilización *in vitro* o en la inyección intracitoplasmática en los ovocitos (James *et al.*, 2002). Los métodos empleados para criopreservar espermatozoides eyaculados no son convenientes para ser usados con los obtenidos del epidídimo, a menos que sean añadidos componentes similares a los encontrados dentro del epidídimo, en la solución del diluyente de criopreservación (Barrios, 2002). Estudios realizados muestran que los espermatozoides recuperados de especies post-mortem, incluso muchas horas después, mantienen su función normal y su capacidad de fertilizar. Espermatozoides del epidídimo con una MP de 70 a 90 % pueden ser obtenidos varias horas después siempre y cuando los órganos sean refrigerados inmediatamente (Barrios, 2002). Según Anel *et al.* (2002), dependiendo del intervalo entre la recuperación de los espermatozoides y la muerte, la motilidad espermática disminuye significativamente entre las 24 y 48 h. Después de las 48 horas post-mortem, todas las medidas de calidad del espermatozoide disminuyen progresivamente. Por otro lado, Martins *et al.* (2009), almacenó las muestras de epidídimo durante 72 h a 5 °C, encontrando que la MP total disminuyó después de 48 h y los otros parámetros no fueron afectados por cualquiera de los periodos de almacenamiento. Resultando que las muestras pueden almacenarse por largos periodos de tiempo a 5°C, cuando los espermatozoides no pueden ser criopreservados inmediatamente después de la muerte del animal. El objetivo del presente trabajo es criopreservar espermatozoides de bovino obtenidos de la cola del epidídimo vs conducto deferente de toros post-mortem.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los testículos se obtuvieron post-mortem de bovinos adultos procedentes del rastro municipal de Morelia, Michoacán. Se recolectaron un total de 10 testículos intactos, sin escroto, con conductos deferentes, cuyos extremos fueron ligados. Los testículos fueron colocados dentro de bolsas plásticas selladas y transportados en un termo con agua fría (25°C). Se estimó el tiempo transcurrido desde la recolección de los testículos en el rastro hasta el procesamiento de cada uno de ellos en el laboratorio, sin sobrepasar las 6 horas. Los testículos bovinos fueron procesados en el Laboratorio de la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal (USIRA) de la FMVZ-UMSNH en el municipio de Tarímbaro, Michoacán. Los espermatozoides se obtuvieron de la cola del epidídimo (CE) y del conducto deferente (CD) mediante el protocolo de flujo retrógrado que a continuación se describe: los CD y la CE fueron limpiados cuidadosamente removiendo la túnica serosa y los vasos sanguíneos con un bisturí con hoja del N° 10 y tijeras pequeñas. Se localizó el “septum” (indentación) del epidídimo correspondiente a la porción cercana de la zona media de la CE. Allí se realizó un corte transversal con el bisturí. La porción de la CE, libre de la capa visceral, se colocó en una placa de Petri con medio Triladyl® (5 ml) sobre una termoplatina a 35 °C. Se procedió a diseccionar la CE hasta que apareció el contenido epididimario, representado por un líquido espeso y cremoso y se recuperó en el medio Triladyl®. Las porciones libres de los CD se colocaron en una placa de Petri a 35°C y se mantuvieron sujetos con una pinza de hemostasia. Se colocó una aguja con punta roma (calibre 20-23 según el diámetro interno de los conductos) dentro del lumen de la porción libre del CD. Se adaptó una jeringa de 10 ml con medio de dilución Triladyl® y se perfundió lentamente dentro del lumen de cada CD. Al aparecer el contenido espermático, representado por un líquido blanco y cremoso, se continuó perfundiendo con la jeringa y diluyente hasta que el fluido recolectado se observó más

claro y diluido. Posteriormente se procedió a realizar la evaluación macroscópica donde solo se determinó el volumen recuperado mediante la medición en un tubo de centrífuga graduado; en la evaluación microscópica de los espermatozoides, se determinó la concentración espermática mediante un hemocitómetro (cámara de Neubauer); la morfología anormal (MA) y viabilidad espermática (V), mediante un frotis teñido con eosina-nigrosina observado al microscopio de contraste de fases (Conejo, 1991). La MP de los espermatozoides se determinó transcurridos entre 40 minutos a 1 hora ya que después de este lapso puede ser estimada. Para la criopreservación del semen, la muestra obtenida se diluyó en la solución comercial Triladyl® en una proporción de 1:3, suplementada con 20 % de yema de huevo. Posteriormente los espermatozoides diluidos se envasaron en pajuelas de 0.5 ml con una concentración de  $200 \times 10^6$ . Las pajuelas se mantuvieron a una temperatura de 5 °C durante 2 horas. Después fueron sometidas a vapores de nitrógeno (-120 °C) durante 10 minutos, colocando las dosis sobre una rejilla de acero inoxidable a una distancia de 4 cm por arriba del nitrógeno líquido. Posteriormente, se sumergieron en nitrógeno líquido a -196 °C durante 2 minutos y se almacenaron en el termo criogénico hasta su evaluación. Para descongelar las muestras, se tomó una de las pajuelas y se mantuvo 1 minuto a baño maría (Fisher Scientific) a 37 °C. Después se realizó la evaluación microscópica (MP y V) de los espermatozoides post-descongelación. Los valores de tasa de motilidad progresiva y viabilidad de cada tratamiento se analizaron empleando un modelo lineal generalizado considerando a los tratamientos como efecto fijo, las diferencias entre medias se evaluaron empleando la técnica de diferencias mínimas significativas. En el caso de la tasa de morfología anormal de los espermatozoides colectados en conducto deferente y epidídimo tanto fresco como congelados las tasas se analizaron empleando un modelo lineal generalizado considerando los tratamientos como efecto fijo, las diferencias entre medias se evaluaron usando las diferencias mínimas significativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a los espermatozoides frescos obtenidos de la CE se observó una MP de  $71.7 \pm 2.6$  mientras que, para los obtenidos del CD, la MP fue de  $75.0 \pm 4.5$ . Respecto a la tasa de V se obtuvo un  $68.7 \pm 4.8$  y  $79.2 \pm 5.6$  para los obtenidos de la CE y del CD respectivamente (tabla I); la MA fue de  $57.17 \pm 5.9$  para los espermatozoides de la CE y  $42.33 \pm 6.02$  para los espermatozoides del CD (tabla II).

**Tabla I.** Motilidad progresiva, viabilidad y morfología del espermatozoide fresco y congelado (*Progressive motility, viability and morphology of fresh and frozen semen*).

Tratamiento	% Motilidad progresiva	% Viabilidad
Semen fresco conducto deferente	$75.0 \pm 4.5^a$	$79.2 \pm 5.6^a$
Semen fresco epidídimo	$71.7 \pm 2.6^a$	$68.7 \pm 4.8^a$
Semen congelado conducto deferente	$40.8 \pm 7.4^b$	$51.3 \pm 13.4^b$
Semen congelado epidídimo	$35.8 \pm 5.8^b$	$40.5 \pm 9.8^b$
Medias generales	$55.8 \pm 18.7$	$59.9 \pm 17.5$

<sup>a,b</sup> Literales diferentes dentro de la columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

Saavedra *et al.*, (2012) obtuvieron una MP de 51.5, una V del 77.17 y una MA de 29.50 en semen fresco obtenido del epidídimo de toros de Lidia post- mortem, estos datos difieren de los expuestos en el presente trabajo ya que, respecto a la MP, los resultados obtenidos en este trabajo son mayores en un 20 % a lo reportado por Saavedra *et al.* (2012). Sin embargo, la V fue menor y

la MA sobrepasa este parámetro. Albers y Barrios (2006), recuperaron espermatozoides obtenidos del epidídimo y conducto deferente en toros post-mortem utilizando un medio a base de Tris-yema de huevo y obtuvieron un porcentaje de MP del 50 % en semen fresco, este resultado es menor comparado a lo presentado en este trabajo donde en la MP es mayor tanto en los espermatozoides obtenidos de la CE y CD.

**Tabla II.** Tasa de morfología anormal de espermatozoides en semen fresco y congelado colectado de la cola del epidídimo y conducto deferente (*Rate of abnormal morphology of spermatozoa from fresh and frozen semen collected from tails epididymis and vas deferents*).

Tratamiento	% Morfología anormal
Semen fresco de conducto deferente	42.33 ± 6.02 <sup>a</sup>
Semen fresco de cola del epidídimo	57.17 ± 5.91 <sup>b</sup>
Semen congelado de conducto deferente	41.00 ± 7.04 <sup>a</sup>
Semen congelado de cola del epidídimo	55.71 ± 8.71 <sup>b</sup>
Media general	49.00 ± 10.00

<sup>a,b</sup> Literales diferentes dentro de la columna indican diferencias significativas (P<0.05)

Los resultados obtenidos post-descongelación para los espermatozoides de la CE y del CD en este trabajo fueron: para la MP se observó una tasa de 35.8 ± 5.8 y 40.8 ± 7.4 y para la V fue del 40.5 ± 9.8 y 51.3 ± 13.4 respectivamente (tabla I). Para la MA post-descongelación se obtuvo una tasa del 41.00 ± 7.04 y 55.71 ± 8.71 para el CD y CE, respectivamente. Los resultados de V son mayores a lo reportado por Sánchez *et al.* (2009), donde obtuvieron un 32.96 % de V post-descongelación utilizando un diluyente comercial a base de Tris-yema de huevo (Triladyl). Ribeiro *et al.* (2014) congelaron espermatozoides de bovinos post-mortem mediante el método convencional obteniendo un 29.5 % de MP y una V de 53.9 % post-descongelación. Respecto a la MP este resultado se encuentra por debajo de lo reportado en este trabajo. Sin embargo, la V es mayor en un 13 %. Martins *et al.* (2007) mencionan que la MP de los espermatozoides colectados del epidídimo, sufre una caída significativa después del proceso de criopreservación sin sufrir más alteraciones significativas. Se han reportado valores inferiores a los observados en los espermatozoides frescos, entre el 10 y el 45 % de MP, lo que está de acuerdo a lo observado en este trabajo, además de lo reportado por González (2004) en bovinos y Rodello *et al.* (2005) en ovinos. La MP y V de los espermatozoides mostrados en este estudio, después de ser congelados, podrían ser consideradas para su uso en la IA.

## CONCLUSIÓN

Los resultados muestran que no existen diferencias en los parámetros estudiados de los espermatozoides después de ser congelados, independientemente de si se obtuvo de la cola del epidídimo o del conducto deferente, respecto a la MP y V. Sin embargo, referente a la MA si existen diferencias estadísticas, siendo mayor la tasa de MA en los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo. Por lo que se sugiere colectar los espermatozoides del conducto deferente ya que es sencillos de obtener y presentan menos anomalías.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH y al rastro municipal de la ciudad de Morelia, Michoacán por todas las facilidades otorgadas.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Albers A.M. y Barrios A.D. 2006. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros post-mortem obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Trop.*, 24(3): 267-280.
- Anel L., Guerra C., Álvarez M., Anel E., Martínez A.F., Boixo C.J., Kaabi M., Herraes P., Paz P. (2002). Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus Hispanicus*). *Theriogenology*. 57: 577.
- Barrios A.D. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. Memorias: XI Congreso Venezolano de Producción e Industria animal. Venezuela. P. 1-13.
- Conejo N.J.J. (1991). Manual de inseminación artificial del ganado porcino con semen diluido. Editorial de la Universidad Michoacana. Morelia, Mich. México.
- González R.A. (2004). Tesis Doctoral: Efecto de la criopreservación usando diferentes técnicas de congelación y crioprotectores sobre parámetros espermáticos y la integridad de la membrana de los espermatozoides bovinos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Sao Paulo, Pirassununga, Brasil.
- González S.J.A., Tadeo R.J.C., Ortega C.C., Toledano O.A., Vergara O.M., Avalos R.A. (2013). Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos post-mortem en caninos. *Rev. Salud Anim.* 35 (2): 137-141.
- Hishinuma M., Suzuki K., Sekine J. (2003). Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus Nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 59: 813-820.
- James A.N., Green H., Hoffman S., Landry A.M., Paccamonti D., Godke R.A. (2002). Preservation of equine sperm stores in the epididymis at 4°C for 24, 28, 72 y 96 horas. *Theriogenology*. 58: 401-404.
- Kaabi M., Paz P., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., Rouissi H., Herraes P., Anel L. (2003). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60(7): 1249-59.
- Martins C.F., Rumpf R., Pereira D.C., Dode M.N. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 326-331.
- Martins C.F., Driessen K., Melo C.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 epididymes stored at 5°C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.* 116: 50-57.
- Munguia V.J. 2011. Valoración espermática post-mortem obtenida de la cola del epidídimo de carnero y venado cola blanca.
- Ribeiro P.A., Munita B.L., Yumi K.M., Mello M.M.I., 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.
- Rodello L., Azevedo H.C., Bicudo S.D., Maia M.S., Sousa D.B., Sicherle C.C. (2005). Comparación entre sistemas automatizado y convencional/vapor de nitrógeno líquido para la criopreservación de semen ovino. Memorias: Congreso Brasileño de Reproducción Animal. Goiania, Brasil.
- Saavedra G.D., Mas A., Sanes J.M., Vallejo P., Matas C., Seva J.I. (2012). Parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos post-mortem en el toro de lidia. *AN. VET. (Murcia)*: 28:7-13.
- Sánchez I.V., Aguiar L.A., Erosa D.S., Cervera P.D., Avilés A.V., Navarrete S.L., Magaña S.H., Baeza R.J., Ortíz de la Rosa B., Ramón U.J. (2009). Congelación post-mortem de semen de toro lidiado. Yucatán.