



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DEL
EPIDÍDIMO POST-MORTEM”**

TESINA QUE PRESENTA:

URIEL MARTÍNEZ VICENTE

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

ASESORA:

MC. IRMA ARCELIA TOSCANO TORRES

MORELIA, MICHUACÁN, AGOSTO 2018.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a la máxima casa de estudios, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), por albergarme tantos años en ella y brindarme su apoyo para poder cumplir mis sueños.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), por darme la oportunidad de realizarme como persona, por brindarme compañeros y maestros excelentes los cuales fueron una parte muy importante para poder llegar hasta donde estoy, y de la cual siempre estaré orgulloso y llevaré siempre en mi mente.

Agradezco a la Unidad de servicios Integrales en Reproducción Animal (USIRA), por nutrirme con su conocimiento y aprendizaje de la cual siempre estaré agradecido por haberme abierto sus puertas y hacerme una gran persona para la sociedad.

A mi asesora de tesina MC. Irma Arcelia Toscano Torres por brindarme su apoyo, su tiempo, dedicación y paciencia para realizar esta investigación.

A la MC. Ingrid Brenda Olivo Zepeda por apoyarme en todo momento incondicionalmente, gracias a sus consejos he podido concluir satisfactoriamente con el trabajo realizado.

DEDICATORIA

A mis padres Higinia Vicente de Jesús y Francisco Martínez Hernández por brindarme todo su cariño y apoyo durante todo este tiempo, por darme la oportunidad de terminar una carrera, y por siempre estar a mi lado y sobre todo por creer en mí. Son mi gran impulso en la vida y mi ejemplo a seguir por todo mil gracias.

A mis hermanos por estar conmigo en todo momento de mi vida, por brindarme todo su cariño, gracias por brindarme alegrías y sobre todo apoyo total para yo poder cumplir con mis sueños.

INDICE

1	RESUMEN	1
2	ABSTRACT	1
3	INTRODUCCIÓN	2
4	OBJETIVO	4
5	ANTECEDENTES	4
5.1	CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-MORTEM EN CANINOS.....	4
5.2	CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-MORTEM EN RUMIANTES	6
5.2.1	BOVINOS	6
5.2.2	OVINOS.....	8
5.2.3	CIERVOS	10
5.2.4	ALPACAS	12
5.3	CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-MORTEM EN CERDOS.....	13
5.4	CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-MORTEM EN EQUINOS	14
6	CONCLUSION	18
7	BIBLIOOGRAFIA	19

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados de la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem en especies silvestres y domésticas.....	17
--	----

1 RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión de literatura sobre la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem en diferentes especies. La criopreservación de espermatozoides es una biotecnología reproductiva que busca promover su conservación por un tiempo indeterminado el cual puede ser utilizado en cualquier momento y lugar. Diversas especies de mamíferos silvestres y domésticos están en peligro de desaparecer, lo que ha propiciado la aplicación y búsqueda de técnicas para recuperar y conservar su material genético. La criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem es una alternativa para la conservación de material genético y tal vez la última opción para mantener la conservación de generaciones futuras. Esta técnica se ha realizado en caninos, bovinos, ovinos, ciervos, alpacas, en cerdos y equinos encontrando buenos resultados post-descongelación, logrando así que esta técnica sea recomendable para mantener el germoplasma de las especies silvestres y domésticas por un largo tiempo. Se concluye que en la actualidad aún existe poca información sobre la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem, sabiendo que este puede ser, tal vez, el último recurso para mantener las generaciones siguientes de animales.

Palabras clave: criopreservación, espermatozoides, epidídimo, post-mortem, viabilidad, movilidad, post-descongelación, especies.

2 ABSTRACT

The aim of the present work was to carry out a literature review on the cryopreservation of spermatozoa obtained from the post-mortem epididymis in different species. The cryopreservation of sperm is a reproductive biotechnology that seeks to promote its conservation for an indeterminate time which can be used at any time and place. Several species of wild and domestic mammals are in danger of disappearing, which has led to the application and search for techniques to recover and preserve their genetic material. The cryopreservation of spermatozoa obtained from the post-mortem epididymis is an alternative for the conservation of genetic material and perhaps the last option to maintain the conservation of future generations. This technique has been performed in canines, cattle, sheep, deer, alpacas, pigs and horses, with good post-thawing results, making this technique advisable to maintain the germplasm of wild and domestic species for a long time. It is concluded that at present there is still little information about the cryopreservation of spermatozoa obtained from the post-mortem epididymis, knowing that this may be, perhaps, the last resort to maintain the following generations of animals.

Keywords: cryopreservation, spermatozoa, epididymis, post-mortem, viability, mobility, post-thawing, species

3 INTRODUCCIÓN

La obtención de espermatozoides del epidídimo potencialmente fecundantes se realiza principalmente por dos eventos importantes, la maduración y el almacenamiento espermático ya que la maduración o desarrollo progresivo de la capacidad fecundante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y el almacenamiento ocurre en la cabeza del epidídimo (Hafez, 2002). Por ello se sabe que al criopreservar espermatozoides del epidídimo se logran fecundaciones favorables ya que los espermatozoides tienen una viabilidad favorable para lograr su objetivo.

La criopreservación del semen es una importante biotecnología reproductiva, ya que busca promover la conservación del germoplasma masculino por un tiempo indeterminado, el cual puede ser utilizado en cualquier momento y en el lugar donde se requiera. Esta biotecnología, cuando se asocia con la inseminación artificial (IA) es un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona al productor, una reducción a los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como prevenir el riesgo de transmisión de enfermedades por vía sexual y para conservar los genes de los progenitores de alto valor genético (Castelo *et al.*, 2008).

Los espermatozoides fueron las primeras células en ser criopreservadas. Las especies en que se iniciaron estos estudios fueron: ranas, gallos, bovinos y humanos. El éxito del procedimiento en las tres últimas especies, fue por el descubrimiento del glicerol en 1949 (Holt, 2000). Este procedimiento se desarrolló casi empíricamente hace más de 60 años y hoy en día se continúa empleando (Leibo y Bradley, 1999; Holt, 2000).

Los espermatozoides de varias especies presentan diferente sensibilidad al enfriamiento. En la fase inicial de la congelación, los espermatozoides presentan una disminución en la permeabilidad de la membrana (Devireddy *et al.*, 1999; Devireddy *et al.*, 2004), disminuyendo la viabilidad de los espermatozoides, causado

por el tratamiento isotónico y pérdida de componentes intracelulares, estos daños son ocasionados por la deshidratación, rehidratación de las células (Holt y North 1984, De Leeuw *et al.*, 1990, Drobnis *et al.*, 1993) y la transición de la fase de los lípidos (Buhr *et al.*, 1994).

En la actualidad diversas especies de mamíferos silvestres y domésticos, están en peligro de desaparecer, lo que ha propiciado la aplicación y búsqueda de técnicas para recuperar y conservar su material genético (FAO, 2010). Una de estas técnicas es la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem.

El conocimiento de técnicas de recuperación y conservación de espermatozoides provenientes del epidídimo de animales post-mortem, está bien documentado, por ejemplo, Songsasen *et al.* (1998) realizaron fertilización *in vitro* con espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo de ratones 24h post-mortem. An *et al.* (1999) realizaron fertilización *in vitro* con éxito, utilizando espermatozoides vivos de ratón recuperados de testículos refrigerados durante 7 días post-mortem. Yu y Leibo (2002) demostraron que los porcentajes de movilidad, integridad de la membrana y la integridad del acrosoma de los espermatozoides obtenidos post-mortem, no fueron afectados después de 8 días en refrigeración a 4°C. Martínez *et al.* (2005) observaron que la movilidad de los espermatozoides es menor cuando son recuperados mediante flujo retrógrado de la cola del epidídimo y esta movilidad aumenta poco tiempo después de ser incubados a 37° C antes de ser sometidos al proceso de congelación ($84.5\% \pm 1.5\%$) y disminuye al ser descongelados ($67\% \pm 1.8$), mientras que el daño acrosomal aumenta significativamente de $3.2\% \pm 0.7\%$ a $8.1\% \pm 1.2\%$. Según estudios realizados por Kaabi *et al.* (2003), la movilidad de los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo, es el parámetro más afectado al ser conservados a 5°C. El objetivo de esta revisión de literatura fue sobre la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem en diferentes especies.

4 OBJETIVO

Realizar una revisión de literatura sobre la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem en diferentes especies.

5 ANTECEDENTES

5.1 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-MORTEM EN CANINOS

En 1776 Lázaro Spalanzani ya había observado que el frío disminuía el metabolismo de los espermatozoides y permitía su conservación. Esta observación llevo a la conservación de semen por periodos cortos de tiempo de (2 a 4 días) con capacidad fecundante (Peña, 1997).

En los países con un mayor desarrollo, la inseminación artificial (IA) con semen congelado de caninos se aplica cada vez más debido a las posibilidades que esta técnica brinda. El primer nacimiento de una camada obtenida gracias a la técnica de IA con semen congelado fue en 1969 (Smith, 1986).

La IA despertó el interés de especialistas en reproducción y criadores. Gracias a esto se crearon bancos de semen en universidades y entidades privadas en diferentes lugares del mundo, con el objetivo de preservar diversas razas (Fastard, 1989). En los caninos la obtención y conservación post-mortem de espermatozoides viables de la cola del epidídimo, se ha considerado como una técnica de gran importancia para la preservación de animales con alto valor genético (Armas *et al.*, 2011).

Actualmente la recuperación de espermatozoides potencialmente fértiles almacenados en la cola del epidídimo no es una técnica sencilla, lo que ha llevado a implementar diversas metodologías que permitan recuperar espermatozoides viables para ser preservados (Yu y Leibo, 2002).

Existen diversos factores que determinan la viabilidad de los espermatozoides como, por ejemplo: el tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta la congelación de los espermatozoides, así como el manejo y la temperatura del epidídimo durante este tiempo. Estos factores son condicionantes para la supervivencia y capacidad fecundante de los espermatozoides (Armas *et al.*, 2011).

González *et al.* (2013), evaluaron la calidad de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninos antes y después de ser criopreservados a -196 °C en nitrógeno líquido, 3, 24, 48 y 72 horas post-mortem. Los resultados mostraron que el promedio de espermatozoides con movilidad progresiva disminuyó significativamente ($p < 0.05$) después de las 48 horas donde se obtuvo un 70.45%-25.85%, post-mortem y post-descongelado, respectivamente. El promedio de espermatozoides vivos al descongelar fue de 73% a las 3 horas post-mortem y de 62% a las 24 horas.

Armas *et al.* (2011), realizaron un trabajo similar a las 0, 24, 48 y 72 horas después de realizar una orquiectomía en perros, encontrando los mejores resultados de movilidad total (79.5 %) y de integridad funcional de la membrana (76.43%) a las 0 horas de la obtención de los espermatozoides, antes del proceso de criopreservación. Sin embargo, los resultados post-descongelación fueron del 17% y 50.46% para la movilidad total y la integridad funcional de la membrana, respectivamente. Armas *et al.* (2011) también mencionan que es posible obtener espermatozoides del epidídimo viables para ser sometidos al proceso de criopreservación, hasta las 48 horas de la orquiectomía.

Estos resultados indican que hay una variación respecto al tiempo de recuperación de los espermatozoides del epidídimo, ya sea post-mortem o después de una orquiectomía de canino. Sin embargo, Santos *et al.* (2013) y Armas *et al.* (2011) coinciden en que se obtienen espermatozoides viables y funcionales, para someterlos al proceso de criopreservación, antes de las 48 horas.

5.2 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-MORTEM EN RUMIANTES

5.2.1 BOVINOS

El bovino fue la especie donde se obtuvieron los mejores resultados de la criopreservación, la resistencia que tienen los espermatozoides al frío, permitió obtener partos en vacas por IA con semen congelado. Esta técnica fue difundida rápidamente por la mejora en la descendencia en la producción de leche y carne (Sánchez, 2007).

Según se ha reportado, los espermatozoides que se encuentran en el epidídimo de toros que acaban de morir aún conservan su capacidad fertilizante (Chung, 1997; Reyes Moreno *et al.*, 2002). Por lo que es importante establecer un método que permita obtener espermatozoides de toros de alto valor que hayan muerto repentinamente para conservar su material genético. En la actualidad ya se ha reportado en la literatura científica dos nacimientos de bovinos originados de espermatozoides post-descongelación colectados de la cola del epidídimo de bovinos hasta las 72 horas post-mortem (Melo *et al.*, (2011).

Olivo *et al.* (2017), tuvieron como objetivo evaluar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo (CE) y del conducto deferente (CD) de bovinos post-mortem, evaluando movilidad progresiva (MP), viabilidad(V), y morfología anormal(MA), utilizando la técnica de flujo retrógrado junto con un diluyente comercial Triladyl®. Obteniendo en los espermatozoides frescos de la CE y del CD con relación a la MP un 71.7 ± 2.6 y 75.0 ± 4.5 respectivamente. Respecto a la V obtuvieron 68.7 ± 4.8 y 79.2 ± 5.6 para los obtenidos de CE y CD respectivamente. La MA que encontraron fue de 57.17 ± 5.9 para CE y para CD 42.33 ± 6.02 para los espermatozoides de la CE y CD post-descongelación la MP que obtuvieron fue de 41.0 ± 7.84 y 55.7 ± 8.71 respectivamente.

Ribeiro *et al.* (2014), compararon dos métodos de criopreservación convencional y automatizado, utilizando espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. Donde encontraron una movilidad y una viabilidad de 74 % y 69% respectivamente en los espermatozoides frescos; en el semen post-descongelado encontraron un 29% y un 25 % de movilidad y un 35 % y un 52% de viabilidad con el método convencional y el método automatizado, respectivamente.

Novoa *et al.* (2013), criopreservaron espermatozoides de bovinos obtenidos de la cola del epidídimo, utilizando un diluyente comercial a base de tris-yema de huevo. Obteniendo un 40% de movilidad total y 35% de movilidad progresiva post-descongelación. También determinaron el porcentaje de espermatozoides con anomalías, el cual fue del 34% previo a la congelación.

Saavedra *et al.* (2012), determinaron los parámetros testiculares (peso y circunferencia escrotal) en toros de lidia, así como también la calidad seminal de los espermatozoides obtenidos del epidídimo, recuperados 12 horas post-mortem refrigerados a 5°C. Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes: el peso de los testículos osciló entre los 293-323 gr. y la circunferencia escrotal fue de 33.5-36.5 cm. Para los parámetros de calidad seminal fueron: 50-53% de movilidad individual, 73-77% de viabilidad, 23-31% de anomalías espermáticas en los testículos recuperados, donde no encontraron diferencias significativas entre los testículos, sin embargo, Saavedra *et al.* (2012) sugieren que los testículos con mayor peso presentaban una mejor calidad seminal. También estos resultados indican que es viable la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo para la preservación de recursos genéticos.

Albers *et al.* (2006), evaluaron la movilidad individual de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo post-mortem de toros cebú. Los testículos fueron transportados a dos temperaturas: 35°C y 25°C. Se realizaron dos lecturas de la movilidad individual, una inmediatamente después de recuperados los espermatozoides (post-lavado) y otra posterior a la incubación de 40 minutos a 37°C

(post-incubación). Los resultados obtenidos fueron de 17% (post-lavado) y 34% (post-incubación) de movilidad individual transportados a 35°C y para los testículos transportados a 25°C la movilidad individual fue de 8% (post-lavado) y 26% (post-incubación). Según los valores obtenidos por Albers *et al.* (2006) recomiendan transportar los testículos a una temperatura de 35°C y determinar la movilidad individual de los espermatozoides 40 minutos a una hora post-incubación, ya que después de ese tiempo hay una mejor medida de movilidad espermática epididimaria debido a una disminución del efecto supresorio que ejercen los fluidos epididimarios sobre esos espermatozoides y la reoxigenación y dilución durante el proceso de recolección espermática.

5.2.2 OVINOS

Los espermatozoides de ovino, vasado en el ciclo espermatogénico dura aproximadamente 40 días, cada ciclo se basa en las divisiones de la espermatogonia madre, entre intervalos de 10,5 días. Esto asegura la supervivencia continua de los espermatozoides. Siendo que la última etapa de maduración se lleva a cabo en el epidídimo entre los 10 hasta los 14 días. La maduración de los espermatozoides involucra la capacidad de una movilidad progresiva, la modificación de patrones metabólicos, la formación de la cromatina nuclear, membrana plasmática, la pérdida de inclusión citoplasmática y el reordenamiento estructural del acrosoma todo esto para mantener su supervivencia y pueda ser fecundante (Coy, 1995).

Un espermatozoide viable y maduro, debe ser una célula alargada, recubierta por la membrana plasmática conformada por una cabeza aplanada conteniendo el núcleo y el extremo anterior del núcleo cubierto por el acrosoma (Garner y Hafez, 2000).

El espermatozoide de ovino tiene en comparación con otras especies muy altos niveles de fosfolípidos, ácidos grasos polinsaturados y niveles muy bajos de colesterol (Davis, 1981) y (Jones y Mann, 1977).

Al llevar acabo la criopreservación de espermatozoides de ovinos el principal impedimento para realizarlo es el daño celular o la muerte completa. (Quinn y col., 1969). Y esto con lleva a una menor posibilidad fecundante que la obtenida con semen fresco (Watson, 2000).

Gomes (2017), su objetivo fue evaluar espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem en ovinos, a una temperatura ambiente de 18 a 25°C estos refrigerados a 5 °C, posteriormente criopreservados, evaluando el tiempo máximo en el cual es posible recuperar espermatozoides en movimiento, de 0 horas hasta las 48 horas post-mortem. Asiando el análisis se observó que de 0 horas hasta llegadas las 24 horas post-mortem los espermatozoides tienen una mejor movilidad del 70% siendo que a las 48 horas post-mortem los espermatozoides tienen una movilidad del 39%. Observando los resultados menciona que se pueden conservar espermatozoides con una buena viabilidad hasta las 24 horas post-mortem y pueden ser fecundantes.

Shokrollahi (2014), realizo una comparación con el gradiente continuo Histoprep® y el swip-up para aislar los espermatozoides del epidídimo de ovinos post-mortem. Estos fueron almacenados a 4 y 6°C durante 24 horas, al realizar las pruebas encontraron una mejor proporción de espermatozoides aislados con el gradiente Histoprep® 0.1% mayor al swip-up con 0.06%. Mostrando su calidad para el aislamiento de espermatozoides del epidídimo en el caso de Histoprep®, con relación al swip-up fue mayor en términos de calidad espermática y para la fertilización.

Gomes *et al.* (2017), tuvieron como objetivo identificar subpoblaciones de espermatozoides recuperados del epidídimo de ovino hasta las 48 horas post-mortem, al igual que en el semen recogido con vagina artificial, adicionando 20% de plasma seminal al extensor congelante para una mejor criopreservación, identificando tres subpoblaciones recuperadas post-mortem y por vagina artificial, la subpoblación 1 fue la que mejor resultados obtuvo a las 24 horas post-mortem

con 74%, la subpoblación 2 y subpoblación 3 respectivamente 9.8% y 15%. Con la adición del 20% de plasma seminal solo se obtuvo un buen resultado a las 24 horas con un 81% pero de igual forma fue disminuyendo paulatinamente en las demás subpoblaciones. No tomando en cuenta los espermatozoides a las 48 horas por no tener las subpoblaciones deseadas.

Vásquez *et al.* (2012), recolectaron espermatozoides del epidídimo de ovinos pre-congelación observando la movilidad progresiva, viabilidad y la membrana plasmática, utilizando un diluyente TES-TRIS-yema de huevo que contenía cinco crioprotectores, en tres diferentes concentraciones 2.5%, 5% y 10%, enfriados a una temperatura de 4 °C durante 1 a 3 horas y observaron que no hubo diferencia significativa entre todos los crioprotectores con respecto a la viabilidad, excepto con el glicerol al 2.5% a 1 hora con un 40% de movilidad progresiva, siendo el mejor para criopreservar espermatozoides.

5.2.3 CIERVOS

El desarrollo de técnicas de reproducción asistida aplicadas en ciervos en los últimos 35 años ha llegado a expandirse rápidamente gracias a diferentes criadores al rededor del mundo (Asher *et al.*, 2000).

Entre las principales técnicas de reproducción asistida podemos encontrar en primer lugar a la IA, en segundo lugar, la transferencia de embriones múltiple (MOET), y por último la producción *in vitro* de embriones (IVP). Ya que estas juegan el papel más importante en la conservación genética, mejorándola generación tras generación (Fernández *et al.*, 2006).

Los espermatozoides al ser obtenidos del epidídimo, no entran en contacto con el plasma seminal asiéndolas susceptibles a los procesos bacteriológicos, por ello el empleo de antioxidantes, es una de las formas más útiles para la criopreservación del material genético aumentando la viabilidad por un largo tiempo (Chatterjee *et al.*, 2001).

Villaverde (2012), estudió los efectos de congelación sobre la calidad de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo del ciervo Ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*), descongelados post-mortem, refrigerados a 5°C. Comparando la calidad de almacenamiento en pajillas y en tubos de 15 ml post-descongelado dando como resultado una mejor movilidad del 74% en pajillas y un 69 % de movilidad en tubos no encontrando diferencia significativa en los dos estudios.

Garde *et al.* (1998), observaron muestras de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de ciervos post-mortem, clasificándolas en alta calidad inicial (ACI) y en baja calidad inicial (BCI), los criterios mínimos establecidos para clasificar una muestra como ACI fueron, movilidad individual (MI)>50 % y acrosomas intactos (AI) >75 %. Obteniendo un 76% de movilidad individual en la prueba de ACI y en BCI observaron un 45% de movilidad individual. Observando espermatozoides con una mejor ACI. Utilizaron tres tipos de diluyentes, citrato-fructuosa, tris-lactosa y TriladyI®, en los espermatozoides de ciervo post-mortem observaron las características post-descongelación, en la muestra ACI con respecto al MI se encontró al TriladyI® con el valor más alto con un 49% comparado con la MI en muestras de BCI con un 38%. En el mismo trabajo compararon el efecto del TriladyI® como mejor diluyente en 17 hembras, inseminadas *in vivo* con los espermatozoides obtenidos de la BCI, determinando solo la fecundidad de 4 ciervos.

Iniesta (2012), trabajó con un diluyente de congelación Tris-citrato-fructuosa utilizando tres antioxidantes (crocina, melatonina y trolox), sobre la calidad seminal obtenidos del epidídimo de ciervos ibérico (*Cervus elaphus hispaicus*) post-descongelación, teniendo en cuenta que los espermatozoides se encontraban previstos de plasma seminal pudiendo sufrir un daño oxidativo, al descongelarlos por citometría de flujo se pudo obtener un mejor resultado con el antioxidante crocina representando un 50% de viabilidad de espermatozoides al descongelarlo, ya que fue la única capaz de disminuir el porcentaje de apoptosis junto con la muestra control.

5.2.4 ALPACAS

Las técnicas de criopreservación de semen de alpaca son muy limitadas debido a su escaso desarrollo de diferentes pruebas a los espermatozoides, (Bravo *et al.*, 2000).

El semen de alpaca tiene la característica de ser pobre en calidad y suele ser altamente viscoso, esto hace difícil su manejo, dilución y evaluación. Trabajos sobre la criopreservación reportan que contiene entre 6 y 20 % de movilidad después de la descongelación, (Vahughan *et al.*, 2003) y raramente supera el 40%. (Santiani *et al.*, 2005). Reportaron 45% pero sin dar detalles que permitan la réplica de su método (Bravo *et al.*, 1996).

En años recientes varios investigadores han trabajado en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca y han obtenido mejores resultados, reportando mejores propiedades con relación a la membrana plasmática, refiriéndose con exactitud a la diferencia de la obtención de las muestras (eyaculado o epidídimo) (Morton *et al.*, 2010).

Canorio *et al.* (2015), evaluaron dos crioprotectores alternativos para la conservación lenta de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca (*Vicugna pacos*), los cuales fueron, dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilacetamida (DMA). El crioprotector con cual obtuvieron mayores resultados fue con el DMA con 60% de viabilidad de los espermatozoides post-descongelación.

Choez (2016), obtuvo la concentración espermática utilizando tres crioprotectores para conservar espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca siendo: glicerol, etilenglicol y dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO y el glicerol obtuvieron los mejores resultados con un 38% y un 33% de movilidad respectivamente post-descongelación no encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cayllahua y Quispe (2003), determinaron la movilidad de espermatozoides obtenidos de alpaca (*Viguta pacos*), utilizando muestras mayores a 75% de movilidad, evaluando tres protocolos de criopreservación, andromed (tratamiento 1), glicerol (tratamiento 2) con 99.5% de pureza y etilenglicol con 99% de pureza (tratamiento 3). Observando los resultados a la post-descongelación concluyeron que ninguno de los crioprotectores cumplía con los valores suficientes de viabilidad, obteniendo en las muestras el 30% (tratamiento 1), (tratamiento 2) 2% y en el (tratamiento 3) no se encontraron espermatozoides vivos. Para estos resultados fueron valorados en rangos de buena calidad del 80.95% de espermatozoides vivos.

5.3 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-MORTEM EN CERDOS

La criopreservación de espermatozoides se inició de forma experimental con un enfoque hacia la IA en el año 1949. Polge *et al.* (1949) descubrieron el glicerol como crioprotector de los espermatozoides, esto en un medio de congelación. Los espermatozoides de los cerdos son muy sensibles al frío, en temperatura menores de 15°C, se observan daños en la membrana plasmática y acrosómica que determinan alteraciones en la célula; además con temperaturas bajas de congelación se deteriora el citoesqueleto, el ADN, incrementa la oxidación celular y se producen pérdidas de enzimas; cualquiera de estas alteraciones provoca daños irreversibles en la viabilidad y funcionalidad de la célula espermática. En las primeras congelaciones realizadas en los años 50 y 60, la calidad seminal post-descongelación era muy mala, y no se consiguieron partos en cerdas inseminadas.

En Murcia, España, en el año 1972 Vicente Sarmiento de la Estación Pecuaria presentó al Congreso Mundial de IA y Reproducción Animal el primer trabajo con resultados favorables de fertilidad utilizando semen de cerdo congelado en pajillas. En 1975 se publicaron dos métodos de congelación de semen de cerdo que sirven de base de las utilizadas hasta el día de hoy: en EEUU Pursel y Johnson (1975) congelaron en píldoras y en Alemania Westendorf *et al.* (1975) en pajillas de 5 ml. Aunque con esto mejoró notablemente la calidad del semen post-descongelación,

en la fertilidad y tamaño de la camada los resultados no fueron los deseados, esto se alejaba de los resultados obtenidos con la mona natural. (Sánchez, 2007).

Rath *et al.* (1996), compararon la fertilidad de espermatozoides de cerdo del epidídimo y semen eyaculado, en ovocitos de cerdas con fertilización *in vitro*. Obtuvieron resultados favorables con los espermatozoides obtenidos del epidídimo logrando la fertilización del 72.2 % y 6 % a las 2 horas congelado-descongelado, siendo este similar al semen eyaculado mejorando la capacidad fertilizante de los espermatozoides del epidídimo descongelados a las 8 horas. Las tasas de formación y evolución del pronúcleo, con significativamente más embriones desarrollando de 2 y 4 células en comparación con los grupos fertilizados con semen eyaculado descongelado (59.7 % respecto a 14.6% y 16%).

Kikuchi *et al.* (1997), evaluaron la movilidad y criopreservación de espermatozoides de cerdo, enfriados a 4 °C obtenidos del epidídimo. Prosiguiendo a su observación después de la post-descongelación, calificando la capacidad de fecundación de los espermatozoides *in vitro*, logrando buenos resultados con espermatozoides almacenados y descongelados al primer y segundo día, observando una buena penetración monodérmica del 64% y 90% respectivamente y una formación pro nuclear masculina de 67% a 71%.

5.4 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES POST-MORTEM EN EQUINOS

Las características de producción y los usos deportivos en la especie equina pueden provocar la muerte súbita de un animal. En los caballos se produce con mayor frecuencia que en el resto de las especies domésticas debido a la presentación de cuadros traumáticos como principal causa de morbilidad y mortalidad (Owen *et al.*, 2012). De igual manera, los cólicos pueden llevar a la muerte o al sacrificio de animales de alto valor genético. Son sometidos a castración lo que lleva a la pérdida de su capacidad reproductiva (Aurich, 2006). En estas circunstancias la única opción de recuperar espermatozoides viables, es a partir de los epidídimos de los

animales fallecidos y probablemente la única oportunidad de la que se dispone para salvar su material genético (Cary *et al.*, 2004; Bruemmer, 2006).

En el epidídimo y el conducto deferente contienen el 62% y el 7% de reservas de espermáticas, respectivamente (Amann *et al.*, 1978). Las condiciones que se encuentran en la cola del epidídimo mantienen a los espermatozoides maduros en un estado de reposo (Mann, 1981). De un par de epidídimos se puede recolectar un total de 15 a 25 millones de espermatozoides (Bruemmer, 2006; Monteiro *et al.*, 2011; Guimarees *et al.*, 2012).

El primer potro nacido por IA con semen congelado fue hace más de 50 años, como resultado de la inseminación con espermatozoides epididimarios, se obtuvo una tasa de preñez del 17 % (Barker y Gandier, 1957). Estos datos demostraron la capacidad fecundante de los espermatozoides obtenidos del epidídimo, además de que no hubo más información sobre gestaciones y nacimientos en yeguas inseminadas con semen procedente del epidídimo (Morris, 2002; Monteiro *et al.*, 2011). Se han realizado trabajos de IA en yeguas con espermatozoides congelados obtenidos del epidídimo, logrando gestaciones mediante el depósito del semen en el cuerpo del útero y cuernos uterinos mediante histeroscopia (Morris, 2002).

Gonzales *et al.* (2015), utilizó testículos de potros criollos, con la finalidad de evaluar el efecto del diluyente a base de lactosa-EDTA-plasma seminal, sobre la viabilidad de los espermatozoides epididimarios pre-congelación y post-descongelación. Obtuvieron una viabilidad de 48% y 40% en el semen fresco y descongelado, respectivamente.

Vieira (2013), evaluó espermatozoides obtenidos del epidídimo de caballo refrigerados a 4°C durante varios días (hasta 96 horas) antes y después de la criopreservación. Encontrando que la viabilidad espermática no mostró descenso hasta haber transcurrido 72 horas de conservación, siendo superior al 80% en cambio a las 96 horas descendió a 77%. También analizó la viabilidad de los

espermatozoides a los 30 minutos de haber sido diluidos en el medio de congelación a 4°C, observó que la viabilidad mantuvo valores similares durante las primeras 48 horas (76%) y hubo una reducción posteriormente a las 72 y 76 horas. Finalmente determinó la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados mediante la activación de ovocitos y la formación de pronúcleos masculinos y femeninos.

Hernández *et al.* (2012), evaluaron los efectos de congelación sobre la viabilidad de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de equinos a 4 °C, seleccionando solo las muestras que presentaban del 30% de movilidad progresiva, obtuvieron una viabilidad del 72% post-congelación y 8 días después de la congelación, obtuvieron un 60 % de viabilidad.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en diferentes especies silvestres y domesticas (tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo post-mortem en especies silvestres y domésticas.

Autor y año	Especie	% de viabilidad	% de movilidad progresiva
<i>Kikuchi et al. (1997)</i>	Cerdos		90% post-descongelación
<i>Villaverde (2012)</i>	Ciervos		74% post-descongelado
<i>Saavedra et al. (2012)</i>	Bovino	77% post-descongelado	
<i>Gonzáles et al. (2013)</i>	Caninos	73 % post-descongelación	
<i>Vieira (2013)</i>	Equinos	80% post-descongelación	
<i>Canorio et al. (2015)</i>	Alpaca	60% post-descongelación	
<i>Gomes et al. (2017)</i>	Ovino		81% post-descongelación

Se muestran los parámetros de viabilidad y movilidad progresiva de espermatozoides post-descongelación, en diferentes especies.

6 CONCLUSIÓN

La criopreservación de los espermatozoides es una biotecnología reproductiva que busca promover la conservación del germoplasma por mucho tiempo. Hasta la fecha aún hacen falta investigaciones sobre el tema de la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo y conducto deferente. Además, esta técnica puede ser, tal vez, el último recurso para mantener a las generaciones siguientes de animales vulnerables, así como de alto valor genético.

7 BIBLIOGRAFIA

- Albers, M., y Barrios, D. (2006). Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros post-mortem obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Trop*, 24(3): 267-280.
- Armas, S., Fernández, V., Vásquez, M., y Santiani, A. (2011). Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. *Rev Inv Vet Perú*, 22(3): 199-205.
- Asher, G., Berg, D., Evans G., Salamon, S., y Maxwell., W. (2000). Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim Reprod Sci*, 62:195–211.
- Amann, R., Thompson Jr, D., Squires, E., y Pickett B. (1978). Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions.
- Barker, C., y Gandier, J. (1957). Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa.
- Bravo, Pw., Ordoñez, C., y Alarcón, V. (1996). Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. Sydney, Australia.
- Canorio, N., Paredes, F., y Valdivia, M. (2015). Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*vicugna pacos*). *Rev Inv Perú*, 26 (3): 434-443.
- Choez, K. (2016). Determinación de la concentración óptima de distintos agentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Cayllahua, J., y Quispe, Y. (2013). Evaluación de tres protocolos de criopreservación en la vialidad de espermatozoides epididimarios de alpaca (*vicugna pacos*). Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica-Perú.
- Castelo, TS., TR., frota., y AR., silva. (2008) Consideracoes sobre a criopreservao do semen de caprinos. *Acta Vet Bras*, 2:67-75.
- Coy, P. (1995). Reproducción en ovejas y cabras. *Mc Graw-hill-Interamericana*. Madrid, 937-950.
- Chung, J. (1997). Effects of sperm treatments on fertilization and in vitro development of bovine follicular oocytes. *Emb. Trans*, 12(2):189-194.
- Chatterjee, S., y Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev*, 59: 451–458.

- Devireddy R, Swanlund D, Roberts K, Bischof J. (1999) Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents (online). *Bio Reprod*; 61:764-775. www.highwire.edu (2011, febrero 20).
- Davis, B. (1981). Timing of fertilization in mammals: *Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval Cell Biology* 78 (12): 7560-7564.
- Fernández-Santos, R., Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Esteso, C., Soler, J., Paz P., Anel L., y Garde, J. (2006). Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *J. Androl.* 28:294–305.
- FAO, (2010). Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal production and health guidelines N°12. Roma.
- Fastard, W., y Andersen-Bergn, K. (1989). Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fertil*, 39: 289-229.
- Garner, D., y Háfiez., E. (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. Reproduction in farm animals. *Philadelphia*, 96-109.
- Garde, J., Ortiz, N., García, A., López, A., y Gallego, L. (1998). Criopreservación post-mortem de material espermático e inseminación artificial en el ciervo ibérico. *Arch. Zootec*, 47: 351-356.
- Gonzales, H., Rodríguez, C., Oropeza, A., Wong, Y., Llanos, J., y Gonzales, H., (2015). Uso de plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de equinos. *Rev Inv Vet Perú*, 26(2): 351-356.
- Gomes, T. (2017) Preservao e fertilidade de espermatozoides ovinos recuperados de epididimos mantidos a temperatura ambiente (18 a 25°C) até 48 horas post mortem. Universidade federal do Paraná. Curitiba.
- Gomes, T., Weiss, R., Emandes, L., Dimas, S. (2017). Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. *Animal Reproducción Sciense*.
- Guimarães, T., Lopes, G., Ferreira, P., Leal, I., Rocha, A. (2012). Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science* 136: 85-89.
- Hafez, ESE. (2002). Preservación y criopreservación de gametos y embriones. *MacGraw-Hill*. 441-452.

- Hernández, P., Fernández, R., Rodríguez, S., Soto, M., Verona, J., y García, R., (2012). Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Rev. Salud anim.* 34(2):84-88.
- Holt., W., V., y North, R. D. (1984). Partially irreversible cold-inducen lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze fracture study. *Journal of experimental. Zoology*, 230:473-483.
- Iniesta, M. (2012). Efecto de diferentes concentraciones de los antioxidantes melatonina, crocina y trolox sobre la calidad seminal a la descongelación en ciervo ibérico. Universidad de Castilla la Mancha, Albacete.
- Kikuchi, k., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J., Shimada, A., Soloy, E., y Kaneko, H. (1998). Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *theriogenology* 50: 615-623.
- Leibo, P., y Bradley, L. (1990) comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. *Cache River Pres*, 501-516.
- Melo, P., Martins, C., Olivera, V., Fonseca, L., Bezerra, J., Costa, H. (2011). Nascimento de bezerros normais após inseminacao artificial utilizando espermatozoides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. *Ciencia Rural*, 41(5):869-874.
- Morton, K., Evans, G., y Maxwell, W. (2010). Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen- thawed epididymal alpaca sperm. *Therio*, 74:311-316.
- Mann, T., y Lutwak-Mann, C. (1981). Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag, Berlin.
- Morris, L. (2002). The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*, 58, 643.
- Martínez-Pator, F., Guerra, C., Kaabi M., Díaz A.R. Anel E., Herraiez P., de Paz P. y Anel L. (2005). Decay pf sperm obtained from epidymes of wild ruminants depending on postmortem time (online). *Theriogenology* 63:24-40 www.highwire.edu (2009 Septiembre 25).
- Novoa, J. (2013). Estandarización de un protocolo de criopreservación de espermatozoides bovinos recuperados de la cola del epidídimo. Universidad de la Salle, Bogota-Colombia.
- Olivo, I., Flores, J., Núñez, R., Val, D., Toscano, I. (2017). Criopreservación de semen obtenido del epidídimo vs conducto deferente de bovinos post-mortem: resultados preliminares. *AICA*, 10:189-194.

- Peña, M. (1997). Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. (Tesis Doctoral), Universidad de Santiago de Compostela.
- Quinn, P., White, I., y Cleland., R. (1969). Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil*, 18, 209-220.
- Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., Mello, M., y Ferreira, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch Med Vet Brasil*, 46: 31-38.
- Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R., y Sirard, M., (2002). Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol. Reprod.* 86(1):159-166.
- Rath, D., y Niemann, H. (1996). In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*, 47: 785-793.
- Saavedra, G., Mas, A., Sanes, J., Vallejo, P., Matas, C., y Seva, J. (2012). Parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos postmortem en el toro de lidia. *An Vet Murcia*, 28: 7-13.
- Santiani, A., Huanca, W., Sapaná, R., Huanca, T., Sepulveda, N., y Sanchez, R. (2005). On the quality of frozen thawed. Alpaca (*vicugna pacos*). And extenders. *Asian J. androl* 303-309.
- Songsasen, N., y Leibo, S., P. (1997). Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice (online). *Cryobiology* 35 255-269. www.Highwire.edu (2010, octubre 20).
- Shokrollahi, E., Barati, F., y Gooraninejad, S. (2014). Efficacy of hitoprep gradient for isolating ovine epididymal sperm. *Small Ruminant Research*, 119:96-99.
- Sánchez, R. (2007). Congelación de semen porcino, historia y evolución. Dpto. reproducción Animal- INIA, España.
- Smith, F. (1986). Update on freezing canine semen. *Philadelphia, PA, Sauders*, 1243-1248.
- Villaverde, S. (2012). Mejora del protocolo de criopreservación espermática en ciervo Ibérico (*cervus elaphus hispanicus*): efectos del tiempo de equilibración y del método de refrigeración y de congelación sobre la calidad espermática a la descongelación. Universidad de Castilla la Mancha.
- Vieira, D. (2013). Estudio de La criopreservación y viabilidad de espermatozoides de epididimo de caballo. Universidad de Murcia.

- Vásquez, J., Nuñez, V., Florentini, E., Gozales, J., Camargo, L., Valdivia, M., (2013). Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. *Livestock Science*, 15(2):94-99.
- Vaughan J., Galloway D., y Hopkins D. (2003). Artificial Insemination en alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries research and Development Corporation. *Australia*. 67-72.
- Vaughan J., Galloway D., y Hopkins D. (2003). Artificial Insemination en alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries research and Development Corporation. *Australia*. 67-72.
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Repro. Sci.* 60(61), 481-1492.
- Yu, I., y Leibo, S., P. (2002). Recovery of motile, membrana-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 C. *Theriogenology*, 57:1179-1190.

