

EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO DE EPIDÍDIMOS DE TORO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN CRIOPRESERVADO

Effect of storage temperatures of bull's epididymis on frozen-thawed sperm quality

Edwin Enrique Valverde-Peralta ¹, Daniel Ernesto Argudo-Garzón ¹, Hernán Patricio Bueno-León ¹, Armando Quintero-Moreno ² y Diego Andrés Galarza-Lucero ^{1*}

¹ Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca. Menéndez y Pelayo y Ave. 12 de Octubre. EC010220. Cuenca, Ecuador. * E-mail: andres.galarza@ucuenca.edu.ec. 0034605146039 (D.A. Galarza)
² Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA), Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia (LUZ). FCV-LUZ. Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A

RESUMEN

La conservación de espermatozoides de epidídimo es una técnica ampliamente usada en animales de alto valor genético, así como en animales silvestres muertos inesperadamente. Uno de los inconvenientes que influyen en la motilidad y integridad de membranas (plasmática y acrosomal) así como en la capacidad de fertilización de los espermatozoides epididimarios recuperados es la temperatura de almacenamiento *post mortem* de los epidídimos. El objetivo de esta investigación fue determinar la calidad espermática pre congelación y post descongelación de espermatozoides epididimarios de toros (*Bos taurus*) de la Amazonía ecuatoriana recuperados de testículos almacenados 5 o 20°C por un corto tiempo. Para este propósito se obtuvieron diez pares de testículos recogidos de un matadero. Los testículos izquierdos y derechos de cada animal fueron almacenados a 5°C (T-5) y 20°C (T-20), respectivamente durante 6 horas (h). La recuperación espermática fue realizada por flujo retrógrado de la cola del epidídimo y el líquido obtenido fue procesado con diluyente AndroMed® a una concentración de 200 x 10⁶ espermatozoides/ mililitros mL y cargado en pajuelas de 0,25 mL. Las pajuelas de ambos grupos, T-5 (n = 30) y T-20 (n = 30), fueron congelados en vapores de nitrógeno líquido y descongeladas a 37°C durante 60 segundos (seg). El efecto de la temperatura de almacenamiento de epidídimos *post mortem* fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Los resultados obtenidos mostraron que en el análisis pre congelación, los porcentaje de motilidad (MIP, evaluada por microscopía óptica), vitalidad espermática (V, integridad de la membrana plasmática evaluada por la tinción de eosina / nigrosina) y anomalías morfológicas totales (AT) de los espermatozoides del grupo T-5 no mostraron diferencias significativas (P > 0,05) con respecto al grupo T-20. En el análisis post descongelación, asimismo los parámetros de motilidad (analizados por un sistema CASA. SpermVision®, Minitube, Alemania) así como las AT, no evidenciaron diferencias significativas (P>0,05) entre los grupos T-5 y T-20. El porcentaje de V post descongelación fue superior (P<0,05) con el grupo T-5 en comparación con el grupo T-20 (63,0 ± 2,6% y 52,9 ± 3,0%, respectivamente). No

obstante, en la evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática mediante prueba hipoosmótica (HOST) mostró mayores porcentajes (P<0,05) con el grupo T-20 en comparación con el grupo T-5 (40,4 ± 3,26% y 31,3 ± 1,99%). En conclusión, los resultados sugieren que, a pesar de las controversias encontradas en la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática luego de la descongelación, los epidídimos de toros sacrificados en condiciones ambientales de la Amazonía ecuatoriana pueden ser almacenados a 5 o 20°C durante un corto período de tiempo y obtener una motilidad e integridad morfológica post descongelación similar. Se recomienda realizar estudios adicionales para evaluar la capacidad de fertilización de éstos espermatozoides mediante la Inseminación Artificial (IA) bajo condiciones de campo.

Palabras clave: Espermatozoides; epidídimo; congelación; sistemas CASA

ABSTRACT

Epididymis sperm conservation is a technique widely used in animals of high genetic value as well as in wild animals dead unexpectedly. One factor that most influence in motility and sperm membrane integrity (plasma and acrosomal) as well as the fertilizing ability of epididymal spermatozoa recovered is *post-mortem* temperature storage of epididymis. The objective of this study was determinate sperm quality pre-freezing and post-thawed of bull epididymal sperm (*Bos taurus*) from the Ecuadorian Amazon recovered from testicles stored to 5 or 20°C for short-time. For this propose, ten pairs of testicles were collected from slaughterhouse. Left and right testicles of each bull were storage at 5°C (T-5 group) or 20°C (T-20 group), respectively during 6 hours (h). Sperm recovery was performed by retrograde flow of the epididymis tail and the liquid obtained was diluted in AndroMed® extender at concentration of 200 x 10⁶ spermatozoa/ milliliters mL and packed in 0.25 mL straws. Both straws T-5 (n = 30) and T-20 (n = 30) groups were frozen in vapors of nitrogen liquid and thawed at 37°C for 60 seconds (sec). The effect of storage temperature of epididymis *post-mortem* were assessment by ANOVA-one way. The results showed that

in pre-freezing analysis, the percentage of motility (analyzed by optical microscopy), sperm vitality (V, plasma membrane integrity analyzed by eosin- nigrosine stain) and total morphological abnormalities (TA) of spermatozoa of T-5 group did not show significant differences ($P>0.05$) compared with T-20 group. In post-thawed analysis, likewise the motility variables (assessed by CASA system, *SpermVision*®, Minitube, Germany) as well as TA did not show significant differences ($P>0.05$) between T-5 and T-20 groups. Sperm vitality (V) in samples thawed was higher ($P<0.05$) with T-5 group than T-20 group ($63.0 \pm 2.6\%$ y $52.9 \pm 3.0\%$, respectively). However, in plasma membrane functionality analysis assessed by hypoosmotic test (HOST) showed higher values ($P<0.05$) with T-20 group than T-5 group ($40.4 \pm 3.26\%$ y $31.3 \pm 1.99\%$). In conclusion, the results suggest that, despite the controversies found in the integrity and functionality plasma membrane post-thawed, the epididymis from Bull slaughtered under environment conditions of Ecuadorian Amazon may be storage at 5 or 20°C during short-term. Additional studies should be made to evaluate the fertilizing ability of these epididymal sperm after artificial insemination (AI) under field conditions.

Key words: Sperm; epididymis; thawing; CASA system

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva que busca promover la conservación espermática de los machos por tiempo indeterminado [34]. Posibilita el uso de semen preservado en amplios programas de mejora genética mediante la inseminación artificial (IA) programada [37]. Además representa una ventaja económica para el productor reduciendo costos de transporte, manejo y alimentación de reproductores [7].

Las pérdidas inesperadas de animales de alto valor genético, así como la dificultad para obtener muestras de semen de especies silvestres condujeron al desarrollo de metodologías que permitieran recuperar y criopreservar el material genético de estos animales [8, 38, 39]. Tal es el caso de la obtención *post mortem* de espermatozoides de la cola del epidídimo de estos animales como una opción viable para preservar su germoplasma para un futuro [14, 40]. El uso de espermatozoides del epidídimo congelados/ descongelados han sido usados en biotecnologías de reproducción asistida como la IA y la fecundación *in vitro* (FIV) con resultados satisfactorios en bovinos (*Bos taurus*) [28] y equinos (*Equus ferus caballus*) [40], entre otros.

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 [21]. Sin embargo, después de la muerte del animal, los gametos no tienen una degeneración rápida, y las condiciones, tales como el tiempo y la temperatura a la que el epidídimo está expuesto, influyen directamente en la supervivencia de los espermatozoides [22].

El tiempo y condiciones óptimas para la recuperación espermática *post mortem* sería inmediatamente después de su muerte del animal; sin embargo, esto generalmente no siempre es posible. Los países tropicales presentan diferentes microclimas, por lo cual la recolección y la conservación apropiada de los espermatozoides del epidídimo inmediatamente de su muerte resulta difícil debido a las temperaturas ambientales muy variables (en Ecuador varían desde trópico bajo con 30°C a las alturas de la cordillera de los Andes con más de 2.500 metros sobre el nivel del mar m.s.n.m con 5°C), y a la falta de recursos humanos y/o equipos para su procesamiento [28].

Diversos estudios han demostrado que cuando se mantienen los epidídimos en frío (0 a 5°C) inmediatamente después de la muerte, la viabilidad de espermatozoides se mantiene durante largo período de tiempo en ciervos (*Cervus elaphus*) [12, 25], verracos (*Sus scrofa domesticus*) [15, 23], ratones (*Mus musculus*) [24], toros (*Bos taurus*) [29] y en caballos (*Equus ferus caballus*) [40]. Sin embargo, se ha demostrado que los espermatozoides viables del epidídimo se pueden recuperar de los ciervos muertos mantenidos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), hasta 24 horas (h) después de la muerte [17]. Además, la supervivencia y motilidad post

descongelación de espermatozoides epididimarios de animales silvestres como la Cabra Montés Ibérica (*Capra pyrenaica*) en temporada de caza, ha sido deseable cuando los testículos han sido almacenados a temperatura ambiente hasta por 8 h, no obstante, si incrementa el tiempo de almacenamiento (por ejemplo hasta 72 h) la temperatura ideal es a 5°C [13, 32]. Existe información limitada sobre el estado vital o de sobrevivencia funcional de epidídimos que conserven espermatozoides viables cuando los epidídimos son conservados a 20°C, lo cual podría ser una situación común cuando el deceso del animal se produce en regiones con estas temperaturas de forma permanente [18]. En consecuencia, se plantea la hipótesis de que el almacenamiento de epidídimos a una temperatura de 20°C, equivalente a la temperatura tropical amazónica Ecuatoriana, (superior a las temperaturas de almacenamiento reportadas) mantiene las características espermáticas para lograr una congelación exitosa como lo hace una temperatura de almacenamiento a 5°C. En efecto, el objetivo de esta investigación que fue evaluar la calidad de espermatozoides congelados/ descongelados obtenidos de la cola de epidídimos que fueron recuperados *post mortem* a partir de toros de matadero, y almacenados a 5 o 20°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y almacenamientos de epidídimos

La recolección de los testículos de los toros se hizo en el matadero del cantón Santiago de Méndez [latitud: -2,71667; longitud: -78,3167; 650 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.)], de la Provincia de Morona Santiago, en la Amazonia ecuatoriana. La recuperación de espermatozoides, procesamiento y evaluación de calidad espermática pre congelación y post descongelación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la granja Irquis de la Universidad de Cuenca (2.700 msnm).

Diez toros *Bos taurus* criados en la Amazonía ecuatoriana fueron seleccionados al azar en el matadero antes del desposte. Los criterios de selección previo al sacrificio de los animales incluyeron a toros sexualmente maduros, entre 2 y 4 años de edad, con un peso promedio de 400 kilos (kg) y una condición corporal entre 3 y 3,5 según la escala descrita por Edmonson y col. [11].

Después del sacrificio, los testículos fueron extirpados del cuerpo del toro con la túnica vaginal e inmediatamente colocados en bolsas plásticas estériles (Ziploc) con solución Ringer Lactato. Los testículos izquierdos fueron almacenados a 5°C (T-5) y los testículos derechos a 20°C (T-20). Las bolsas fueron selladas herméticamente y almacenadas en cajas de poliestireno para su traslado al laboratorio en la ciudad de Cuenca durante un periodo de 6 h para los análisis subsiguientes.

Recuperación, procesamiento y congelación de espermatozoides

En el laboratorio, los testículos fueron secados y removidos su

tejido adyacente del epidídimo bajo condiciones de asepsia con un equipo básico de cirugía. Se ubicó la cola del epidídimo, se insertó un catéter intravenoso No. 20 y se inyectó 1 mililitro (mL) de solución madre (diluyente AndroMed® al 20%) a 37°C y por flujo retrógrado se aspiró el contenido (líquido espeso y de color blanco cremoso), según la metodología descrita por Martínez-Pastor y col. [27]. La muestra fue depositada en una caja de petri estéril a 37°C sobre una platina térmica (Minitube®, Tiefenbach, Alemania). Inmediatamente fue evaluada la concentración espermática mediante un Fotómetro SDM 1 (12300/0102, Minitube®, Tiefenbach, Alemania). El líquido espermático recuperado fue evaluado inicialmente previo a su procesamiento. Las muestras con una motilidad espermática $\geq 50\%$, una viabilidad $\geq 75\%$ y anomalías morfológicas $< 20\%$ fueron incluidas en este experimento. Las muestras fueron diluidas con AndroMed® y ajustadas a una concentración de 200×10^6 espermatozoides/mL (concentración final 50×10^6 espermatozoides/ pajueta de 0,25 mL). Las pajuelas fueron selladas con alcohol polivinílico a 23°C (temperatura ambiente) para luego descenderla hasta 5°C en un periodo de 1 h. Una vez alcanzada esta temperatura, se equilibró por 2 h en una nevera (Haceb®, 320L, México) a la misma temperatura.

Las pajuelas fueron congeladas mediante vapores de nitrógeno líquido (NL₂) colocándolas en una rampa de flotación a 4 centímetros (cm) por encima del nivel de NL₂ durante 10 minutos (min). Luego fueron sumergidas en el NL₂ (-196°C) y almacenadas en un termo para su conservación, de acuerdo a lo detallado por Baracaldo y col. [3]. Un total de 60 pajuelas fueron congeladas (3 pajuelas/ epidídimo) para ambos grupos de almacenamiento de epidídimos T-5 (n = 30) y T-20 (n = 30).

Análisis espermático

Las muestras espermáticas recuperadas fueron evaluadas previamente a la congelación. La motilidad individual progresiva (MIP) fue evaluada subjetivamente por microscopía óptica (CX31®, Olympus®, Japón) con un lente de 20X. La vitalidad espermática (V) y anomalías totales (AT) fueron evaluadas mediante de un frotis después de haber colocado 5 microlitros (µL) de contenido espermático recuperado y 5 µL de eosina-nigrosina en un portaobjetos. El frotis fue observado al microscopio con una lente de 40X, y se contaron 200 células, considerándose vivos a los espermatozoides sin colorear y muertos a los coloreados. Además, la morfología de 200 espermatozoides fue evaluada para determinar el la cantidad anomalías totales. Los resultados fueron expresados en porcentajes.

Las muestra espermáticas congeladas fueron descongeladas a los 7 días (d) sumergiendo las pajuelas en un baño de agua (Memmert®, WNB 10, Alemania) a 37°C durante 1 minuto min. La motilidad espermática fue evaluada mediante un análisis de semen asistido por computadora – CASA (*SpermVision Production- versión 1.01™*. Verona, WI, EUA) adaptado a un microscopio de contraste de fase (Olympus BX41, Olympus Europa GmbH, Hamburgo, Alemania), una platina térmica, una

cámara (Basler camera A301b, Basler AG, Ahrensburg, Alemania) y un adaptador de video (Olympus 0,75 X, Basler AG, Alemania); el sistema fue ajustado y calibrado a una visión estándar para evaluación de semen de toros. Para este propósito, 20 μ L de muestras espermáticas descongelada se colocaron en una cámara Leja® de 8 cámaras (Leja Products B.V., Nieuw-Venep, Países Bajos) sobre una platina térmica a 38°C. Se evaluaron un mínimo de tres campos y 200 movimientos de espermias a 100 X para cada cámara y muestra. Los parámetros de motilidad evaluados fueron el porcentaje de espermatozoides móviles (MT; evaluó el total de células en movimiento con relación al total de células contadas), el porcentaje de espermatozoides con movimientos progresivos (MP, evaluó células con desplazamiento hacia adelante), el porcentaje de espermatozoides con motilidad local (ML, evalúa células en movimiento circular) y el porcentaje de espermatozoides inmóviles (IS, que evalúa células sin movimiento). La V y AT fueron analizadas con el mismo criterio realizado en la evaluación espermática pre congelación. Además, se evaluó la integridad de la membrana espermática mediante la prueba hipoosmótica (HOST, *Hypoosmotic Swelling Test*) colocando 10 μ L de semen en 100 μ L de una solución hiposmótica (fructosa anhidra: 0,675 g/ L y citrato de sodio: 0,268 g/ L, en agua bidestilada, PO 55 mOsm/ L) según lo descrito por Sánchez y col. [36]. La mezcla se incubó a 37°C por 45 min, después de lo cual se hizo un frotis para determinar la proporción de células que respondieron positivamente a esta prueba, bajo un aumento de 100X. Se estimó como respuesta positiva a los diferentes grados de curvatura de colas espermáticas realizando un recuento de 200 espermatozoides por muestra y expresando los resultados en porcentaje [20, 35].

Diseño estadístico

Los resultados fueron expresados en promedios \pm el error estándar de las medias (SEM). Las unidades experimentales en el análisis pre-congelación fueron considerados el líquido espermático recuperado de epidídimos colectados en matadero (n = 20) y las unidades experimentales en el análisis pos-descongelación incluyó las pajuelas congeladas / descongeladas (n = 60). Los valores de las variables espermáticas se distribuyeron normalmente según lo determinó la prueba de Shapiro-Wilk [32]. Se usó un diseño completamente al azar (DCA) y análisis de varianza (ANOVA) de una vía para examinar efecto de dos temperaturas de almacenamiento (grupo T-5 y grupo T-20) de epidídimos antes de la congelación y después de la descongelación sobre los parámetros de calidad espermática. Todos los cálculos fueron realizados usando el software SPSS [19] versión 23.0 (IBM Inc., Chicago, IL, EUA) para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferencias entre los porcentajes de motilidad, viabilidad (V), anormalidades totales (AT) y funcionalidad de la membrana (HOST) de espermatozoides recuperados de epidídimos almacenados a dos temperaturas y evaluados antes de la congelación o después de la descongelación están expuestos en

la TABLA I.

En el análisis pre congelación, los porcentaje de MIP, V y AT de los espermatozoides recuperados de epidídimos almacenados a 5°C (T-5) no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) con respecto a los valores espermáticos de los epidídimos almacenados a 20°C (T-20).

En el análisis post descongelación, asimismo los parámetros de motilidad evaluados por el sistema computarizado CASA (por ejemplo MT, MP, ML) así como las AT, no evidenciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los valores espermáticos de las dos temperaturas de almacenamiento de epidídimos. Los espermatozoides congelados/ descongelados del grupo T-5 mostraron un porcentaje de V superior ($P < 0,05$) en comparación con el grupo T-20. No obstante, con el grupo T-20 los espermatozoides de los epidídimos descongelados mostraron una mayor porcentaje de HOST en comparación con el grupo T-5.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que motilidad e integridad morfológica de los espermatozoides recuperados de epidídimos y almacenados a 5°C no difirieron significativamente de los almacenados a 20°C. Esta misma tendencia de motilidad fue mostrada después del proceso de congelación/ descongelación. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que, aunque la congelación determinada por los parámetros de motilidad e integridad morfológica espermática no es sorprendente, los espermatozoides epididimarios son capaces de sobrevivir a la criopreservación luego almacenar los testículos a 5°C o 20°C durante un corto tiempo (por ejemplo 6 h).

El almacenamiento *post mortem* de testículos de caballos [4, 30], toros [8, 14] y carneros [22] a una temperatura entre 4 a 5°C por al menos 24 h, ha sugerido de que los espermatozoides mantienen su capacidad de fertilización. La cola del epidídimo es el lugar de almacenamiento y maduración de los espermatozoides antes de la eyaculación, y permite que estas células permanezcan viables durante cierto período de tiempo, y los parámetros de calidad espermática, tales como la motilidad, vitalidad y integridad morfológica dependen de las condiciones fisiológicas de esta estructura [2, 9, 33]. Los resultados del presente estudio están de acuerdo con los obtenidos por Durán y col. [10] quienes sugieren que, las temperaturas bajas de preservación (4°C) de epidídimos no parece mejorar la calidad espermática en comparación con las altas, al menos dentro de un período de 8h.

Estudios previos han demostrado que motilidad y la integridad de las membranas espermáticas (plasmáticas y acrosomal) de espermatozoides recuperados de epidídimos *post mortem* almacenados a temperaturas de refrigeración (4 o 5°C), permiten una supervivencia deseable después del proceso de criopreservación [6, 26]. Ribeiro-Peres y col. [34] y Nichi y col. [31] reportaron que los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo conservan mejor su motilidad a bajas temperaturas, debido probablemente a la menor actividad metabólica y la menor

TABLA I
PARÁMETROS DE CALIDAD DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDÍDIMO DE TORO PRE-CONGELACIÓN
n = 20) Y POS-DESCONGELACIÓN (n = 60) (MEDIA ± ERRORES ESTÁNDARES)

Parámetros de evaluación espermática	Temperatura de almacenamiento	
	T-5	T-20
Análisis pre congelación		
Motilidad individual progresiva (MIP,%)	84,0 ± 1,87	67,5 ± 7,04
Vitalidad espermática (V,%)	84,2 ± 2,31	83,7 ± 1,82
Anormalidades totales (AT,%)	12,2 ± 1,49	11,7 ± 0,84
Análisis post descongelación		
Motilidad evaluada por sistema CASA		
Motilidad total (MT,%)	52,0 ± 9,55	59,3 ± 11,06
Motilidad progresiva (MP,%)	27,5 ± 7,77	30,9 ± 6,70
Movimiento local (ML, %)	24,5 ± 2,43	28,5 ± 4,43
Espermatozoides inmóviles (IS,%)	43,3 ± 2,93	39,5 ± 4,41
Vitalidad espermática (V,%)	63,0 ± 2,61 ^a	52,9 ± 2,96 ^b
Anormalidades totales(AT,%)	31,6 ± 1,45	33,8 ± 2,45
Prueba hipoosmótica (HOST, %)	31,3 ± 1,99 ^a	40,4 ± 3,26 ^b

T-5, grupo de almacenamiento de epidídimos a 5°C; T-20, grupo de almacenamiento de epidídimos a 20°C. Letras distintas en cada fila difieren significativamente (P<0,05).

tasa de crecimiento de microorganismos a 5°C. En el presente estudio, la V espermática obtenida después del proceso de congelación/ descongelación de espermatozoides epididimarios fue mayor después de ser almacenados a 5 que a 20°C. Los resultados obtenidos sugieren que los espermatozoides de toro recuperados *post mortem* luego de un almacenamiento a bajas temperaturas poseen una mayor supervivencia espermática post descongelación en comparación con los espermatozoides de epidídimos almacenados a temperaturas altas. No obstante, este valor no se ve reflejado en motilidad ya que los resultados mostraron parámetros de motilidad similares (por ejemplo MT, MP, ML) en ambas temperaturas de almacenamiento.

Por otro lado, se han desarrollado investigaciones previas usando temperaturas altas de almacenamiento (por ejemplo, sobre los 20°C) de epidídimos [1, 16, 39], y los hallazgos sugieren que en estas condiciones la motilidad espermática no se ve afectada, obteniendo resultados deseables a la congelación. En la Amazonía Ecuatoriana, que posee un clima tropical húmedo con temperaturas ambientales elevadas, se acelera la descomposición del cadáver (incluyendo los

epidídimos) lo que podría afectar la motilidad espermática si aumentase el tiempo de almacenamiento. El tiempo óptimo para almacenamiento de epidídimos post mortem es de 2 h [5], no obstante, el incremento del tiempo de almacenamiento de epidídimos expuestos a temperaturas altas que puede afectar la supervivencia de los espermatozoides. Los resultados obtenidos mostraron que la funcionalidad de la membrana obtenida por la prueba de endósmosis (HOST) fue mayor en espermatozoides descongelados provenientes de epidídimos almacenados a 20°C que a 5°C. Por lo tanto, se especula que a los toros muertos durante las primeras 6 h bajo condiciones ambientales trópico húmedas, los espermatozoides del epidídimo conservan mejor la funcionalidad de la membrana plasmática y probablemente, su capacidad de fertilización. Esta misma tendencia, ha sido demostrada por Kaabi y col. [22], aunque el porcentaje de HOST de espermatozoides epididimarios descongelados no difirieron significativamente luego de haber almacenado epidídimos de toros hasta por 48 h.

CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que, a pesar de las controversias encontradas en la integridad (V) y funcionalidad (HOST) de la membrana plasmática luego de la descongelación, los epidídimos de toros sacrificados en condiciones ambientales de la Amazonía ecuatoriana pueden ser almacenados a 5 o 20°C durante un corto período de tiempo y obtener una motilidad e integridad morfológica post descongelación similar. Sin embargo, se recomienda realizar estudios adicionales para evaluar la capacidad de fertilización de éstos espermatozoides mediante la IA bajo condiciones de campo.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, a la administración de la hacienda experimental Irquis y a la DIUC (Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca) por colaborar con los recursos humanos y físicos para desarrollar esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBERS, M.; BARRIOS, D. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado. **Zoot. Trop.** 24(3):267-280. 2006.
- [2] AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reprod. Fertil. Dev.** 5: 361-381. 1993.
- [3] BARACALDO, M.I.; BARTH, A.D.; BERTRAND, W. Steps for freezing bovine semen : from semen collection to the liquid nitrogen tank. In: **IVIS, Reviews in Veterinary Medicine.** IVIS Ed (Internatio) Ithaca NY. Pp 1-11. 2007.
- [4] BARBOSA, L.M.; KANAZAWA, M.Y.; RIBEIRO-PERES, A.; FERREIRA DE S, F. Viability of frozen semen obtained from epididymis of bulls post-mortem **Rev. Bras. Cien. Vet.** 19(3): 190-194. 2012.
- [5] BENÍTEZ-GONZÁLEZ, E.; CHAMBA-OCHOA, H.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, E.; LUZÓN-CEVALLOS, F.; SÁNCHEZ-CARRILLO, J. Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. **Abanico Vet.** 8(1): 59-74. 2018.
- [6] BRUEMMER, J.E.; REGER, H.; ZIBINSKI, G.; SQUIRES, E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. **Theriogenol.** 58:405-407. 2002.
- [7] CASTELO, T.S.; RODRÍGUEZ, T.; RODRIGUEZ, A. Considerations on goat semen cryopreservation. **Acta Vet. Brasilica.** 2(3): 67-75. 2008.
- [8] COSTA, P.; MARTINS, C.; FRANCO, V.; FONSECA, L.; BEZERRA, J.; FERREIRA, H. Birth of normal calves after artificial insemination using cryopreserved spermatozoa obtained from refrigerated epididymides of death bovine. **Cien. Rural.** 41(5):869-874. 2011.
- [9] DE PAUW, I. Bovine semen preservation under epididymal conditions and assessment of sperm quality by means of a sperm-oviduct binding assay. Ghent University. Doctoral Thesis. 150pp. 2003.
- [10] DURÁN, J.P.; ESPINOZA, J.R.; CABRERA, N.C.; APONTE, P.M. Preservación de espermatozoides de la cola del epidídimo bovino en condiciones de campo. **Maskana.** 6: 177-178. 2015.
- [11] EDMONSON, A.; LEAN, I.; WEAVER, L.; FARVER, T.; WEBSTER, G. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. **J. Dairy Sci.** 72:68-78.1989.
- [12] FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 111: 93-104. 2009.
- [13] FICKEL, L.; WAGENER, A.; LUDWIN, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **Eur. J. Wildl. Res.** 53:81-89.2007.
- [14] FORMIGHIERI, M.A.; WEISS, R.R.; THOMAS-SOCCOL, V.; KOZICKI, L. E.; FUJITA, A.S.; AZEVEDO DE A, R.; GREEN, K.T. Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20°C. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 56(5): 777-783. 2013.
- [15] GADEA, J.; GARCÍA-VAZQUEZ, F.; MATÁS, C.; GARDÓN, J.C.; CÁNOVAS, S.; GUMBAO, D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. **J. Androl.** 26(3): 396-404. 2005
- [16] GALARZA, D.A.; SERPA, V.G.; TORRES, C.S.; IÑIGUEZ, C.U. Quality assessment and freezability of epididymal sperm from bulls slaughtered in the slaughterhouse of Cuenca, Ecuador. **Maskana.** 6: 187-188. 2015.
- [17] GARDE J.J.; ORTIZ, N.; GARCIA, A.; GALLEGOS, L.; LANDETE-CASTILLEJOS, T; LOPEZ, A. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. **Archiv. Androl.** 41(3): 195-202. 1998.
- [18] GRIJALVA, J.E.; ARÉVALO, V.; WOOD, C. H. Expansión y trayectorias de la ganadería en la Amazonía: estudio en el Valle de Quijos y Piedemonte, en Selva Alta. Ecuador. **INIAP Arch. Historico.** 125: 1-4. 2004.

- [19] IBM – SPSS para Windows. Version 23.0 Chicago: SPSS Inc. 2015.
- [20] JEYENDRAN, R.; VANDERVEN, H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.; ZANEVELD, L. 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. 1984.
- [21] JONES, R. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: A Hypothesis. **Biol. Reprod.** 71(5): 1405–1411. 2004.
- [22] KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANNEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenol.** 60:1249-1259. 2003.
- [23] KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N.; IKEDA, H.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 48°C. **Theriogenol.** 50(4):615-23. 1998.
- [24] KISHIKAWA, H.; TATENO, H.; YANAGIMACHI, R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. **J. Reprod. Fertil.** 116: 217-22. 1999.
- [25] LEIBO, S.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenol.** 57: 303-326. 2002.
- [26] MALCOTTI, V.; PELUFO, V.; BERGAMO, N.; AISEN, E. Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing–thawing. **Anim. Prod. Sci.** 52(8): 741-745. 2012.
- [27] MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; DÍAZ, A.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian Red Deer. **Theriogenol.** 65(3): 471-485. 2006.
- [28] MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Anim. Reprod. Sci.** 101: 326-331. 2007.
- [29] MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; MELO-COSTA, P.; CARVALHO-NETO, J.O.; DE SOUSA, R.V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. **Anim. Reprod. Sci.** 116(1-2): 50–57. 2009.
- [30] MONTEIRO, G.; PAPA, F.; ZAHN, F.; DELLAQUA, J.; MELO, C.; MAZIERO, R.; AVANZI, B.; ALVARENGA, M.; GUASTI, P. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Anim. Reprod. Sci.** 127(4): 197-201. 2011.
- [31] NICHI, M.; GOOVAERTS, I.G.F.; CORTADA, C.N.M.; BARNABE, V.H.; DE CLERCQ, J.B.P.; BOLLS, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenol.** 67(2): 334-340. 2007.
- [32] PRADIEE, J.; ESTESO, M.C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; SANTIAGO-MORENO, J. Cryopreservation of epididymal sperm from ibexes (*Capra pyrenaica*) using short equilibration time with glycerol. **Theriogenol.** 82: 525-528-2014.
- [33] REYES-MORENO, C.; BOILARD, M.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. A. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. **Biol. Reprod.** 66(1): 159-166. 2002.
- [34] RIBEIRO-PERES, A.; MUNITA-BARBOSA, L.; YUMI-KANAZAWA, M.; MELLO-MARTINS, M.; FERREIRA DE S, F. Criopreservação de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. **Arch. Med. Vet.** 46: 31-38. 2014.
- [35] RUBIO-GUILLÉN, J.; QUINTERO-MORENO, A.; GONZÁLEZ, D. Effect of cryopreservation on integrity of plasmatic and acrosomal membrane of bulls sperm. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIX(4): 382-389. 2009.
- [36] SÁNCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, R. Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. **Arch. Med. Vet.** 34(1):123–130. 2002.
- [37] THIBIER, M.; GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.** 62: 233-251. 2000.
- [38] TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C.A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M.C.; STORNELLI, M.A.; DE LA SOTA, R.L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenol.** 66(6):1637-1640. 2006.
- [39] TURRI, F.; MADEDDU, M.; GLIOZZI, T.M.; GANDINI, G.; PIZZI, F. Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. **Reprod. Domest. Anim.** 47(5):712-717. 2012.
- [40] WEISS, R.R.; MURADAS, P.R.; GRANEMAN, L.C.; MEIRA, C. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. **Anim. Reprod. Sci.** 107(3): 356. 2008.