

**Determinación Del Tiempo De Viabilidad Espermática Y Sus Características  
Seminales En Machos Bovinos De Las Razas Bos Indicus**

**Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario**

**Javier Simón Quintero González**

**Asesor**

**Jorge Andrés Prada Torres**

**M.V, Esp, M.Sc**

**Corporación Universitaria Lasallista**

**Facultad De Ciencias Administrativas Y Agropecuarias**

**Programa De Medicina Veterinaria**

**Caldas - Antioquia**

**2017**

## Contenido

Introducción.....	7
Justificación.....	9
Objetivos .....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos .....	11
Marco teórico .....	12
Una nueva tendencia en las técnicas de biotecnologías de la reproducción .....	12
Inseminación artificial.....	12
Morfología y fisiología del testículo bovino .....	14
Testículo .....	14
Epidídimo.....	16
Morfología y fisiología del espermatozoide .....	19
Cabeza del espermatozoide .....	19
Cola del espermatozoide .....	20
Alteraciones en la morfología de los espermatozoides.....	21
Espermatología.....	22
Sistema CASA o de análisis computarizado.....	23
inconvenientes con el CASA .....	24
Características de las razas <i>Bos Taurus</i> y <i>Bos Indicus</i> .....	25
Materiales y métodos .....	27

Muestras y lugar de obtención.....	27
Manejo de las muestras en el laboratorio .....	29
Análisis y evaluación de la información .....	30
Resultados .....	32
Técnicas de recolección .....	32
Evaluación de la temperatura de almacenamiento .....	33
Discusión.....	38
Conclusiones.....	41
Referencias.....	43

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Corte transversal: distribución tubular y posición del testículo en el toro.....	15
<b>Figura 2.</b> Epidídimo del toro con sus tres porciones: (A) cabeza, (B) cuerpo y (C) cola .....	17
<b>Figura 3.</b> Separación y corte del (A) conducto deferente y de la (B) cola del epidídimo del toro.....	18
<b>Figura 4.</b> Espermatozoide del toro .....	20
<b>Figura 5.</b> Bovino de la raza <i>Bos Taurus</i> , vaca Holstein.....	26
<b>Figura 6.</b> Bovino de la raza <i>Bos Indicus</i> , novilla Brahman .....	26
<b>Figura 7.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar del volumen espermático obtenido en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento. ....	35
<b>Figura 8.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar de la movilidad obtenida en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.....	36
<b>Figura 9.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar de la motilidad obtenida en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.....	36
<b>Figura 10.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar de la velocidad obtenida en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.....	37
<b>Figura 11.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar de la normalidad morfológica de los espermatozoides en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.....	37

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Comparación de las técnicas de recolección de semen para las variables Respuesta, Daño y Volumen recuperado .....	32
<b>Tabla 2.</b> Valores p obtenidos por efecto de los tratamientos y sus interacciones sobre las variables respuesta.....	33
<b>Tabla 3.</b> Promedio y desviación estándar especificados para las variables Volumen y Motilidad en función de cada tratamiento evaluado .....	34

## Resumen

En el presente trabajo se han evaluado 2 tratamientos en la conservación del semen epididimario post mortem en bovinos de las razas Bos Indicus, almacenando el testículo a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración de 5°C en intervalos de tiempo hasta de un máximo de 48 horas, midiendo las variables motilidad, movilidad, morfología espermática. Se analizaron un total de 92 pares de testículos provenientes de la planta de sacrificio FRIGOCOLANTA y dos ganaderías enfocadas a la producción de carne. En el laboratorio se disecciono el epidídimo del testículo y se emplearon técnicas de obtención para la recuperación del semen, la técnica ideal es por compresión por su facilidad de manejo y mínimo costo. Para la evaluación de la técnica de recolección se realizó una prueba de comparación de medias mediante una prueba de Fisher con mínimas diferencias significativas (LSD), empleando un intervalo de confianza de 95%. La evaluación del efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre las variables de respuesta, se realizó a través de un análisis de varianza (ANAVA), se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos de conservación y temperatura de 5°C permitiendo la duración en el tiempo. Finalmente se puede encontrar viabilidad espermática epididimal hasta un máximo de 48 horas post mortem, con una reducción significativa de los valores promedio, lo que implicaría la utilización de este material en técnicas de biotecnología de la reproducción asistida.

**Palabras clave:** testículo, técnicas, post mortem, espermatozoide, epidídimo.

## Introducción

Colombia ha venido aumentando de forma sustancial y significativa el inventario de cabezas de ganado, cambiando los antiguos esquemas de explotación extensivos por sistemas de producción intensivos, técnicos y especializados. La tendencia a mejorar se debe al auge de la producción en menor tiempo y con mayor eficiencia, a la búsqueda de animales que se adapten al suelo y a las condiciones climáticas de la región –así los animales se encuentran establecidos por distintos factores, raza y por el tipo de producción (enfocada a la carne, a leche o al doble propósito), todo esto de acuerdo a la ubicación del predio.

La ganadería es uno de los sectores pecuarios más importantes de la industria nacional, aporta carne, leche y derivados que son productos básicos de la canasta familiar. Es, además, una de las áreas de mayor explotación y consumo, lo que obliga a mantener estándares de calidad y competitividad. Para que una granja sea rentable debe acomodarse a las nuevas tendencias, como las biotecnologías de la reproducción que son áreas encargadas de mejorar la calidad de los animales gracias al uso de técnicas que permiten la expansión y el crecimiento del hato, pues trabajan sobre criterios de selección, se desarrollan de manera directa nuevos animales con características especiales de acuerdo al uso productivo del animal.

Existen tendencias a obtener nuevas herramientas reproductivas y de manipulación genética, siendo la viabilidad espermática post mortem una de ellas. La técnica consiste en obtener semen epididimal por métodos de extracción como lavados retrógrados, compresión de la cola del epidídimo, aspirado con aguja, y macerado. El

epidídimo es un conducto plegado, largo y con función conectora entre el conducto eferente y el deferente, además de poseer esta característica, cumple un papel importante en la maduración y conservación de los espermatozoides: la cabeza y el cuerpo del epidídimo fungen como regiones de maduración y la cola es importante en la conservación de los espermatozoides (Hafez, 1989). Al obtener semen de origen epididimal y al conocerse como un punto de almacenamiento y terminación de maduración del mismo, se debe tener presente la obtención de espermatozoides con restos de gota citoplasmática proximal y distal a nivel del flagelo o cola del espermatozoide (Cole y Cupps, 1977).

La biotecnología de la reproducción permite la conservación y la expansión de la especie gracias a este tipo de técnicas que rescatan el alto valor genético de animales que presentan una muerte natural. Se logra así obtener, después de muerto el espécimen, su fluido espermático, preservarlo y seguir empleándolo, adicionalmente, se puede implementar el uso de este material biológico durante el tiempo de almacenado en un “banco genético” que busca almacenar linajes de alto valor (Leibo y Songsasen, 2002).

Teniendo en cuenta la importancia de la recuperación y valoración de los espermatozoides de origen epididimario a causa de una muerte de un toro de alto valor genético, este trabajo tiene como finalidad establecer la viabilidad espermática post mortem en diferentes tiempos en bovinos de las razas Bos Indicus, bajo dos medidas de evaluación: en fresco y a temperatura de refrigeración de 5 °C.

## Justificación

Ante la nueva tendencia actual a producir bajo unos criterios de consumo, surge la necesidad de prolongar la progenie de animales que presentan un alto valor genético, dando como eje los estándares de calidad que marcan una ganadería y explotación en general. La necesidad de encontrar nuevas herramientas para las técnicas de reproducción permite entrar a evaluar el comportamiento del semen epididimal en el tiempo, capacidad fecundante, movilidad individual, masa, morfología y cantidad de células espermáticas.

El epidídimo tiene principalmente dos funciones: almacenamiento y maduración espermática. La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante, se lleva a cabo en la cabeza y en el cuerpo del epidídimo y, finalmente, la función de almacenamiento se da en la cola del epidídimo (Amann & Schanbacher, 1983). Con esta consideración es necesario señalar la importancia de poder obtener espermatozoides viables de la cola, que tengan una capacidad fecundante poco tiempo después de la muerte, que se puedan utilizar en programas de inseminación artificial en fresco, bajo criopreservación y fertilización in vitro.

Para el presente trabajo de investigación resulta importante conocer y aplicar esta técnica biotecnológica que es una nueva tendencia a obtener semen epididimal de toros que han muerto, poder conocer y valorar sus cualidades, tener mayor información más clara, precisa y consistente de los valores propios de la especie, como lo es la *Bos Indicus* en la región del trópico alto y bajo del norte de Antioquia y Córdoba. Además de ser un método exploratorio permite a productores, estudiantes, técnicos,

profesionales y agremiaciones interesadas en la reproducción y conservación de espermatozoides, conocer nuevas formas de preservar y continuar la progenie de aquellos animales que sobresalen por su raza, especie y trascendencia genética.

## Objetivos

### Objetivo general

Establecer la viabilidad espermática post mortem en bovinos *bos Indicus* en diferentes tiempos posteriores al sacrificio.

### Objetivos específicos

- Identificar y evaluar las diferencias en la motilidad individual y masal, post mortem en la especie Bos Indicus en rangos de tiempo de 2, 4, 6 y 8 horas después de sacrificado el animal.
- Identificar cambios en la motilidad, movilidad y morfología espermática en las variables de conservación en fresco y a temperatura de refrigeración de 5 °C.
- Establecer cambios en el movimiento progresivo de los espermatozoides en rangos de tiempo de 2, 4, 6 y 8 horas después de sacrificado el animal.
- Evaluar las técnicas de obtención de semen epididimal a través de los métodos de compresión y lavado retrógrado.

## **Marco teórico**

### **Una nueva tendencia en las técnicas de biotecnologías de la reproducción**

“La reproducción es un fenómeno esencial para la supervivencia de las especies y, por tanto, la biología y la tecnología de la reproducción tienen un papel esencial en la conservación de la biodiversidad” (Roldán & Garde, 2004). La biotecnología de la reproducción es una de las herramientas técnicas con mayor impacto en la actualidad, gracias a que permite implementar distintos métodos de exploración y procreación de los animales a través de programas de inseminación artificial, transferencia de embriones, clonación, criopreservación y transgénesis. Estos programas permiten al hombre preservar y conservar el material genético de animales de fauna silvestre que se encuentran en vía de extinción o, en el caso de aquellos que se encuentran domesticados, continuar con la línea de alto valor genético logrando así prolongar características de calidad (González et al., 2013).

### **Inseminación artificial**

La inseminación artificial es uno de los componentes que hace parte de la biotecnología de la reproducción, se define como la técnica que permite depositar semen en el tracto genital de la hembra en el momento adecuado y sin presencia del macho, el semen se colecta a través de una vagina artificial o por electroestimulación vía endorrectal, para luego ser distribuido en una cantidad considerable de pajillas que serán almacenadas y, posteriormente, utilizadas. Esta técnica permite dar un mejor uso

al material genético, y representa una mayor eficiencia en la producción de especies domesticadas (Galina, 2008). En las hembras, la deposición de este material se hace vía recto-vaginal, el catéter se introduce por la vaginal hasta el cérvix, se atraviesan los anillos cervicales pasándolos con ayuda de la mano que se encuentra en vía rectal, luego de atravesarlos es depositado el material en el cuerpo del útero (Galina, 2008).

“La inseminación artificial se reporta desde el año 1677 con Leeuwenhoek en el eyaculado de mamíferos de conejos y perros” (Busch & Waberski, 2007). A partir de esta fecha empiezan a surgir nuevos reportes de colecta de semen de diferentes especies animales con instrumentos y métodos prácticos que facilitarían la toma de este producto biológico. El auge de esta nueva tendencia se da a mitad del siglo XX antes y después de la Segunda Guerra Mundial y es cuando grandes potencias empiezan a crear centros de investigación en reproducción, implementando esta nueva técnica en la expansión y mejora de los hatos. El semen obtenido se almacenaba bajo temperaturas de refrigeración, algo que era muy limitado debido a que poco tiempo después era poco viable su uso, finalmente se descubre el almacenamiento a temperaturas de congelación, con medios protectores y en forma de pajilla.

Para la época, una de las ventajas que ofrecía esta técnica era la reducción significativa de enfermedades transmitidas durante el coito sexual (Busch & Waberski, 2007). Estos mismos autores señalan que “según los datos estadísticos de la asociación alemana de criadores de ganado vacuno ADR, en 1950 ya se inseminaba más del 20% de los efectivos vacunos de Alemania y para 1990 fue de un 94.1%” (Busch & Waberski, 2007). Cuando un toro de alto valor zootécnico muere de forma repentina, el material genético que posee también tiende a perderse, por ello la

necesidad de rescatar ese material a través de la colecta del semen que se encuentra almacenado en el epidídimo para luego ser preservado y replicado bajo distintas técnicas de reproducción, como lo son la inseminación artificial in vivo o in vitro (Martins et al., 2007 ).

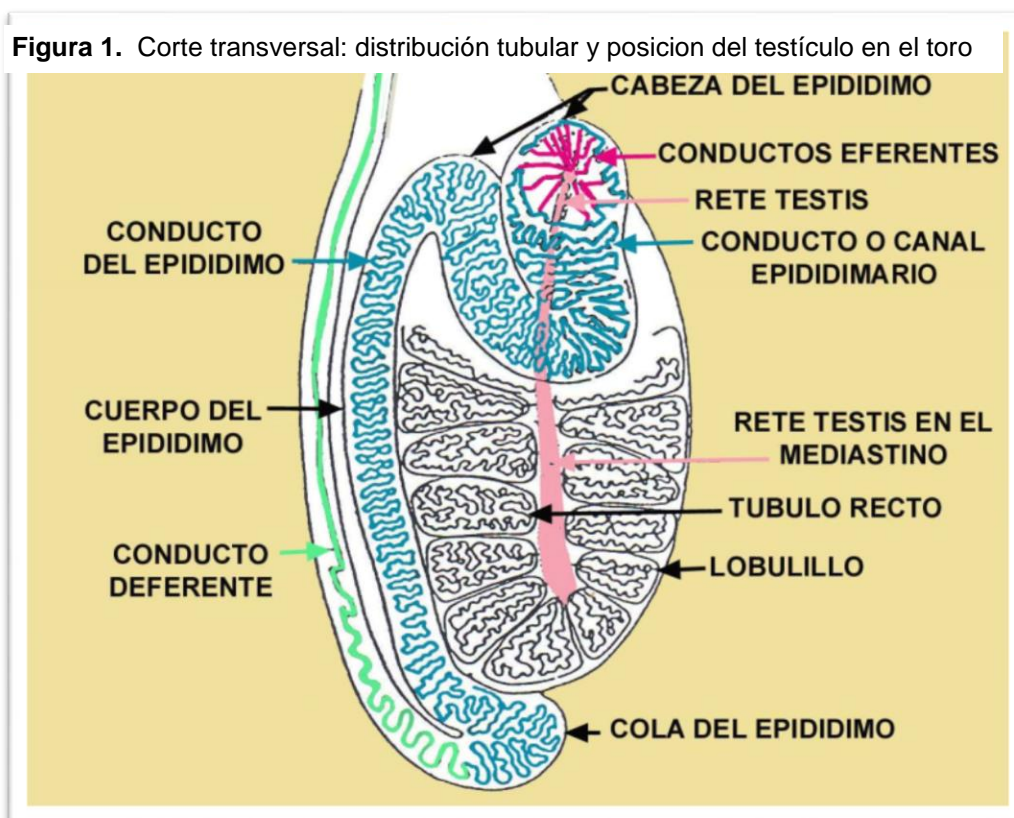
Muchos estudios se han adelantado dada la tendencia a evaluar la viabilidad espermática que existe post mortem bajo condiciones de almacenamiento en refrigeración a 5 °C durante un tiempo de hasta 72 horas (Martins et al., 2009). Se estima que el semen del epidídimo posee características similares o iguales a las del semen eyaculado, a pesar de no poseer el componente energético aportado por las glándulas accesorias, tiene un promedio de motilidad del 60%, con un 68.9% de espermatozoides normales, siendo el mínimo de 31,5% y el máximo de 89,3% de anormales, en este caso el mayor número de defectos se dan por gota citoplasmática distal, y una concentración de espermatozoides de  $1,7 \times 10^9$ , siendo el mínimo de  $0,26 \times 10^9$  y un máximo de  $4,2 \times 10^9$  espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo (Ribeiro-Peres, Munita-Barbosa, Yumi-Kazanawa, Mello-Martins & Ferreira Souza, 2014).

## **Morfología y fisiología del testículo bovino**

### **Testículo**

El testículo se encuentra fuera del abdomen del animal contenido por una bolsa de piel llamada escroto, encargada de proteger y darle soporte a las gónadas, cumple

la función de regulación de la temperatura a través de la contracción involuntaria de la túnica dartos y del músculo cremaster (Busch & Waberski, 2007). Los testículos se encuentran recubiertos por dos túnicas serosas como lo son la túnica vaginal parietal y visceral y una de tejido conectivo llamada túnica albugínea que se encuentra adosada a la pared del testículo, esta última se interioriza al parénquima dividiéndolo en una gran cantidad de lobulillos que contendrán a los túbulos seminíferos y estos se unen en la salida de cada lobulillo formando así la *rete testis*, finalmente continuará como conducto eferente hasta llegar al epidídimo que se dividirá en 3 porciones, cada una con una función específica en el desarrollo y maduración del espermatozoide (Barrios, 2002). En la figura 1 se observa la disposición del testículo externa e internamente.



Fuente: Hafez, 1980.

El testículo tiene dos funciones importantes que son la de producir gametos y hormonas sexuales, en el interior de este se pueden encontrar tres compartimentos para el desarrollo de diferentes procesos fisiológicos.

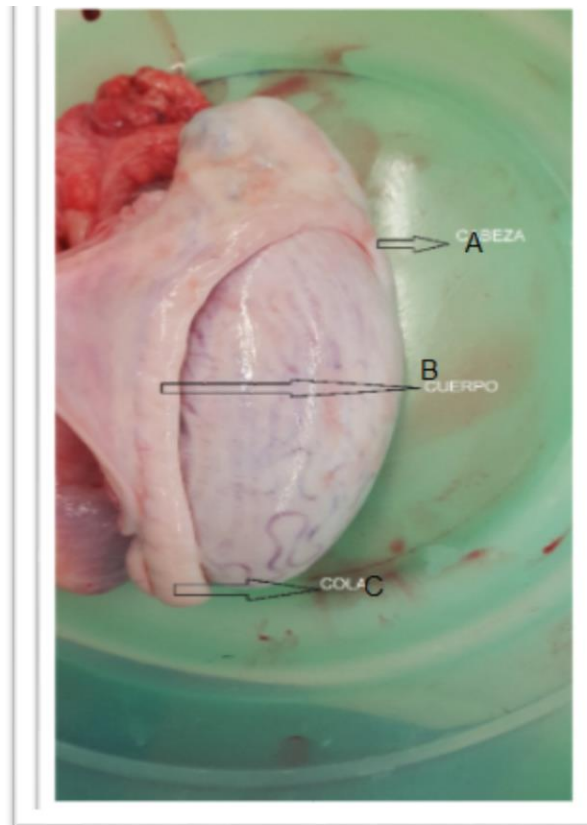
El primer compartimento se encuentra en el intersticio, aloja a las células de Leydig que son las encargadas de producir las hormonas sexuales, como la testosterona y la androstenodiona que es secretada a las venas y a los vasos linfáticos testiculares. En el segundo compartimento, también llamado basal, están las células de sostén o de Sertoli que sirven para controlar la formación de espermatozoides, también están las células espermáticas precursoras conocidas como espermatogonias, finalmente en el último compartimento está el de la luz testicular y es allí donde ocurre la espermiogénesis o diferenciación espermática (Hafez, 2003).

## **Epidídimo**

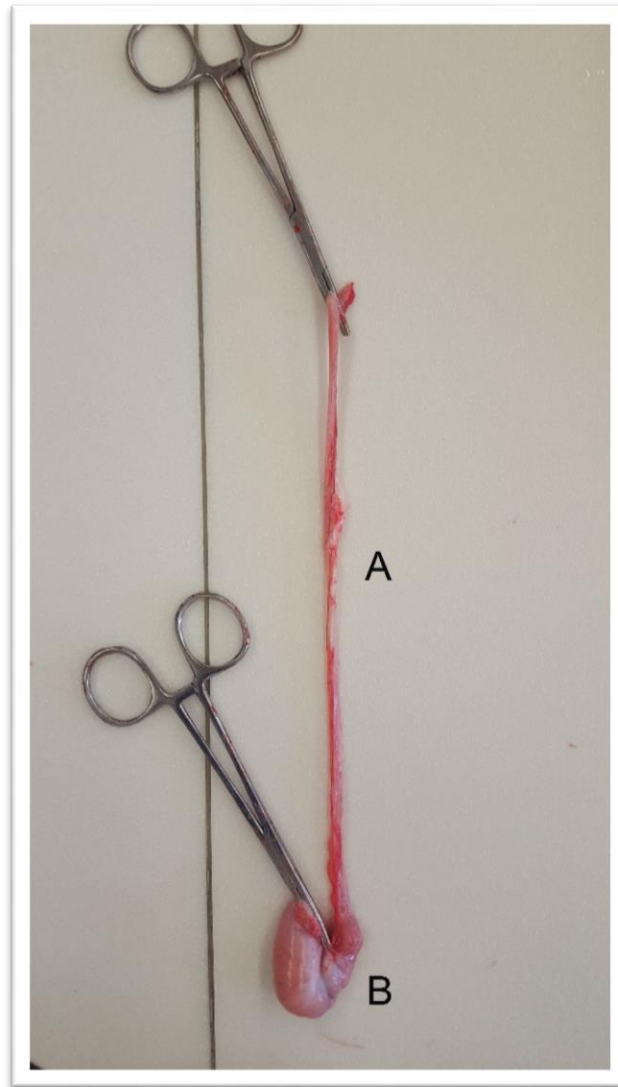
Se deriva de los conductos de Wolff constituidos por una red de tubos que comunican el conducto eferente con el conducto deferente. Es uno de los componentes del testículo que se encuentra externamente y está fuertemente adherido por tejido conectivo. Presenta tres regiones anatómicas conocidas como cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, los dos primeros segmentos tienen una función de maduración y el último segmento con función de almacenamiento (véase la figura 2). Alberga hasta un 75% de los espermatozoides alojados en el epidídimo con una temperatura de 4 o 5 °C por debajo de la corporal. Al epidídimo se le asocian 3 funciones: transporte, maduración y almacenamiento (Busch & Waberski, 2007).

Los espermatozoides son transportados en el epidídimo de forma pasiva con una duración de 1 a 2 semanas. El líquido testicular es absorbido en un 90% en los conductos eferentes conectados a la cabeza del epidídimo, lo que finalmente se resume en una alta concentración de células sexuales almacenadas en esta sección. En el proceso de maduración que se da lugar en la cabeza y en el cuerpo, se busca el aumento en la motilidad y la eliminación de los remanentes citoplasmáticos que se encuentran en el espermatozoide. La capacidad fecundante puede empezar a presentarse cuando va del cuerpo a la cola del epidídimo (Busch & Waberski, 2007).

**Figura 2.** Epidídimo del toro con sus tres porciones: (A) cabeza, (B) cuerpo y (C) cola



**Figura 3.** Separación y corte del (A) conducto deferente y de la (B) cola del epidídimo del toro



Las condiciones que ofrece la cola del epidídimo para el contenido espermático permiten de forma prolongada su preservación pues al estar por debajo de la temperatura corporal reduce el metabolismo y el movimiento de estas células haploides y luego de un tiempo pueden ser eliminadas o recicladas por el organismo. Según

estudios realizados en el Alto Magdalena, la concentración espermática no presenta variación significativa entre toros de las razas *Taurus* e *Indicus* (Vejarano et al., 2005).

### **Morfología y fisiología del espermatozoide**

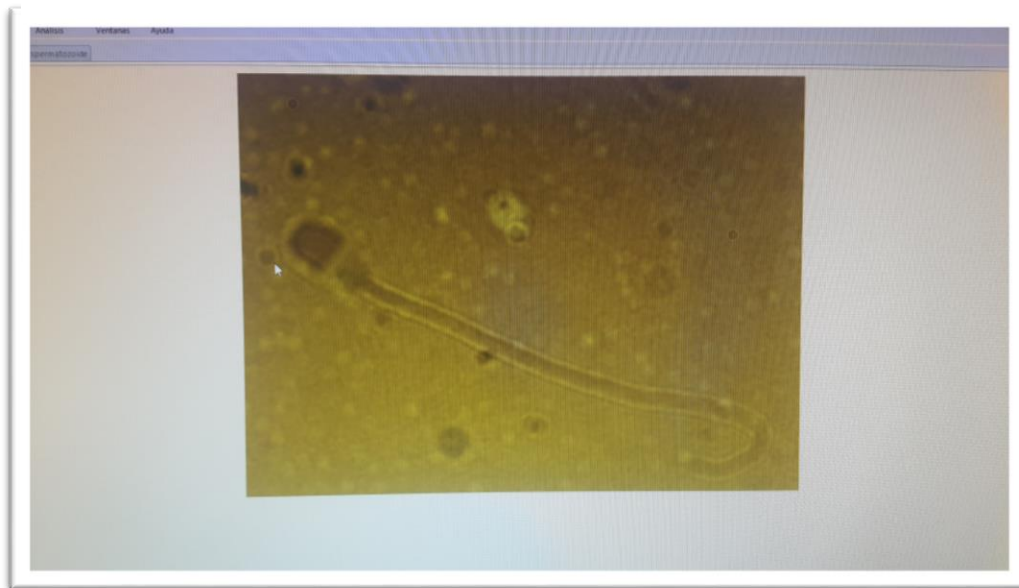
Los espermatozoides son el resultado de largas divisiones mitóticas y meióticas que son llevadas a cabo en la membrana basal de los túbulos seminíferos por las células germinales o espermatogonias. Luego se desprenden para caer a la luz de estos tubos y producirse la diferenciación y así terminar su proceso de maduración y almacenamiento en el epidídimo. Son células largas y aplanadas, con una única función y es la de fertilizar el oocito. En el bovino, esta célula mide aproximadamente 75 micrones de largo, posee dos porciones: una cabeza que contiene todo el componente genético y una cola o flagelo que le aporta la movilidad (Hafez, 2003).

#### **Cabeza del espermatozoide**

Es de forma aplanada y ovalada, compuesta por el núcleo, el acrosoma y la región postacrosómica. El núcleo posee cromatina muy compacta, la condensación de la cromatina está formada por ácido desoxirribonucleico o DNA y por un grupo de histonas espermáticas, el número cromosómico es haploide esto es debido al proceso de división meiótica que se da en el momento de formación. El acrosoma es una membrana de doble capa que recubre en dos terceras partes al núcleo, esta se adhiere a la membrana nuclear y entre ambas se encuentran contenidas las enzimas

hidrolíticas que participan activamente en el proceso de fecundación. Nos referimos a la acrosina, la hialuronidasa, la zonalisina, las esterases e hidrolasas ácidas que cumplen la función de reacción acrosómica y penetración de la zona pelúcida y, finalmente, está la región postacrosómica que se asienta sobre la membrana basal y cumple la función de reconocimiento del oocito durante la fecundación (Hafez, 2003). El sitio de unión entre la cabeza y la cola se denomina cuello y es allí donde se fijan por medio del centriolo que está compuesto por el axonema y este le da movilidad al flagelo. La figura 4 nos ofrece una imagen de un espermatozoide de toro.

**Figura 4.** Espermatozoide del toro



### **Cola del espermatozoide**

Se encuentra dividida en 3 porciones, la primera es la pieza intermedia que va desde el cuello hasta el anillo citoplasmático, contiene una red de nueve pares de microtúbulos que se encuentran dispuestos de forma radial hacia dos filamentos

centrales (9+2), dando estabilidad y movilidad al flagelo -denominado axonema-, esta vaina se encuentra cubierta por mitocondrias dispuestas de forma en espiral y es la que le da la fuente energética para la motilidad espermática. El segundo componente es la pieza principal que va del anillo citoplasmático hasta la punta de la cola. Contiene el axonema y la vaina fibrosa dando mayor estabilidad al componente contráctil de la cola. Finalmente, se encuentra la pieza terminal que esta atrás de la vaina fibrosa solo contiene el axonema central cubierto por la membrana plasmática (Hafez, 2003).

### **Alteraciones en la morfología de los espermatozoides**

En lo que respecta este tema, los estudios reportan alteraciones de dos tipos: las primarias que se presentan por fallas en el proceso de espermatogénesis, como cabeza estrecha, piriforme, ancha o delgada o microencefálicos; y fallas anormales en la cola como gota citoplasmática proximal, cola enrollada, y colas accesorias. Y las secundarias se dan a nivel del epidídimo como cabezas libres, gota citoplasmática distal y colas con curvas. Se reporta que el nivel máximo de tolerancia para defectos de la cabeza es del 20% y para acrosoma y cola de hasta un 25% (Chenoweth, 1997).

Estas alteraciones producen en el espermatozoide fallas en su movilidad y desplazamiento, lo que resulta en una pérdida de la capacidad fecundante. La presencia de células epiteliales, de eritrocitos y de células germinales es también considerada una anomalía de tipo secundario (Barrios, 2002).

## Espermatología

La espermatología tiene como objetivo el estudio y el análisis del semen con el fin de valorar y calificar la capacidad fecundante. Estos análisis se encuentran indicados para estudios andrológicos, diagnósticos y pronósticos de la capacidad reproductiva, entre otros aspectos importantes de los animales sexualmente maduros. En este examen se hacen cuatro tipos de evaluación: macroscópica, microscópica, físico-química y microbiológica.

En el primer parámetro se miden volumen, color y olor; en el segundo parámetro se observan la concentración de espermatozoides, la motilidad individual y masal, las aglutinaciones, el contenido de células y de mezclas extrañas y la morfología de los espermatozoides. En el tercer parámetro se evalúa el pH y la osmolaridad y, por último, en el aspecto microbiano se realizan cultivos para descartar contaminaciones.

Cada uno de estos parámetros y las subdivisiones que contienen arrojan una valoración específica de acuerdo a la especie que se está evaluando. Es de resaltar que las características son las mismas solo que varían en concentraciones y volúmenes. En los últimos años se ha venido mejorando progresivamente el uso de nuevas herramientas de valoración espermática, con mayor grado de sensibilidad y fiabilidad, lográndose estandarizar los métodos de recolección de la información que ahora son más prácticos, rápidos y menos costosos. La espermatología especializada está indicada para muchos procesos en los que se vea baja en la calidad del semen, baja en la conservación del esperma y fertilidad disminuida (Busch & Waberski, 2007).

## **Sistema CASA o de análisis computarizado**

El sistema CASA o análisis computarizado de la motilidad posee un microscopio de contraste que se encuentra conectado a una cámara de video que envía la imagen del microscopio al monitor, haciendo un análisis de captura seriada. Este sistema diferencia a los espermatozoides de otras partículas por su tamaño, y analiza la trayectoria en que se desplaza cada uno de ellos durante una fracción de segundo (Mortimer, 2000; Verstegen, et al., 2002). Algunos autores describen parámetros de mayor utilización por este sistema como lo son: porcentajes de motilidad total o de motilidad progresiva: en función de la velocidad curvilínea (VCL) o de la velocidad media (VAP), los espermatozoides son clasificados en estáticos, móviles progresivos o móviles no progresivos; y dentro de los móviles, en rápidos, medios y lentos (Boyers et al., 1989; Farrell, et al., 1995).

Existen unos parámetros que definen la velocidad de los espermatozoides: VCL (velocidad curvilínea) es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo. VSL (velocidad rectilínea) es la distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo. VAP (velocidad media) es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media. LIN (índice de linealidad) es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea. LIN:  $(VSL / VCL) \times 100$  -STR (Índice de Rectitud): es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad lineal. STR:  $(VSL / VAP) \times$

100 -WOB (índice de oscilación): es la relación porcentual entre la velocidad lineal y la velocidad rectilínea.  $WOB: (VAP / VCL) \times 100$ . (Mortimer, 1997)

Luego de terminar el proceso, el sistema CASA aporta toda una “serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células - móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento” (Amann, 1989; Anzar, et al., 1991).

### **inconvenientes con el CASA**

A pesar de ser un sistema de alta sensibilidad y especificidad este sistema falla debido a que puede sobreestimar la concentración de espermatozoides en las muestras, ya que el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces por el sistema. Por eso se recomiendan hacer buenas diluciones para reducir la sobrestimación. Cada laboratorio o sitio donde se lleva a cabo un análisis por sistema CASA debe estandarizar el método de trabajo para reducir los errores por sobrevaloración (Muiño et al., 2008).

## **Características de las razas *Bos Taurus* y *Bos Indicus***

La ganadería en Colombia ha venido expandiendo de manera creciente sus hatos de forma intensiva, mejorando la calidad genética de sus animales. De acuerdo a la disposición topográfica en la que se encuentre establecido habrá razas de mejor desempeño para la zona, cada una con cualidades propias, el criterio para mejorar razas se basa de acuerdo al fin zootécnico que tenga la explotación. Los bovinos que se encuentran en Colombia hacen parte de dos especies en particular que se adaptan a los diferentes pisos térmicos.

Los bovinos pertenecientes a las razas *Bos Taurus* (ver figura 5) que son animales originarios de Europa, se adaptan fácilmente a los climas templados a fríos, es una especie tranquila, de cabeza corta, orejas cortas y paradas, cuello estrecho, con una musculatura pectoral amplia, profunda y marcada, ombligo y prepucio adosados al abdomen, patas cortas y gruesas. Ejemplos de las razas contenidas en esta especie son: Holstein, Jersey, Ayrshire, Pardo Suizo, Angus, Simmental, Normando, Charoláis entre otras. Mientras que los bovinos de las razas *Bos Indicus* (ver figura 6) son aquellos animales adaptados al trópico bajo de climas templados a cálidos, con una gran resistencia a las altas temperaturas, son muy activos, de cabeza grande, orejas largas y caídas, cuello medio a largo, con giba, musculatura pectoral estrecha, ombligo y prepucio pendulantes, patas largas y gruesas, tren posterior con una musculatura amplia gruesa y marcada, algunas de las razas contenidas en esta especie son: Brahman, Gyr, Guzerat, Nelore (Gasque & Posada, 2001).

**Figura 5.** Bovino de la raza *Bos Taurus*, vaca Holstein



**Figura 6.** Bovino de la raza *Bos Indicus*, novilla Brahman



## **Materiales y métodos**

El estudio se realiza en 92 novillos de las raza Brahman comercial (perlas, rojos y mestizos) bajo las mismas condiciones de alimento y suplementación, con edades entre los 22 y los 35 meses de edad y destinados para la producción de carne, seleccionados todos por edad, sexo y circunferencia escrotal. La selección de estos criterios fueron considerados por los siguientes aspectos: según estudios a mayor edad y circunferencia escrotal el volumen del contenido seminal aumenta (Barrios, 2002).

### **Muestras y lugar de obtención**

Las muestras son recolectadas en la planta de sacrificio de FRIGOCOLANTA ubicada en el municipio Santa Rosa De Osos, un municipio de Colombia, localizado en la región Norte del departamento de Antioquia. Se encuentra ubicado a 2550 msnm con una temperatura promedio de 16 °C. Los límites son: al norte: municipios de San Andrés de Cuerquia, Yarumal, Angostura y Carolina del Príncipe, Al sur: municipios de Don Matías, San Pedro de los Milagros y Entrerríos. Al este: municipios de Carolina del Príncipe y Guadalupe. Al oeste: municipios de Entrerríos, Belmira y San José de la Montaña. Además se encuentra cerca de Medellín a unos 78 km de distancia (Alcaldía de Santa Rosa, 2016).

El Norte antioqueño es catalogado como la ruta de la leche y es gracias a su constante y masiva producción de este líquido. Es por eso que se opta por realizar este trabajo en el sector, por su facilidad, acceso y cercanía a la ciudad. También se trabajó en dos haciendas ubicadas en Puerto Parra, departamento de Santander. Un

municipio de Colombia, localizado en la región central del Magdalena Medio, a unos 105 msnm con una temperatura promedio de 26 a 32 °C. El municipio limita al norte con el municipio de Barrancabermeja, al oriente con Simacota, al sur con el municipio de Landázuri, el de Vélez y Cimitarra. Por el occidente tiene límites con el mismo Cimitarra y con Antioquia (Alcaldía Puerto Parra, 2016). Es una región ganadera y agrícola.

Pasando al tema de la recolección de las muestras, valga decir que los testículos fueron obtenidos sin la bolsa escrotal por lo que se deben almacenar en bolsas *zip-lock* y luego, por selección aleatoria, se distribuyen en dos cavas de icopor, una de ellas contiene hielo para reducir la temperatura y conservar la muestra a 5 °C y la otra a temperatura ambiente. Inicialmente se realiza la evaluación de la técnica de obtención de semen epididimal con el fin de determinar cuál es la más adecuada para la obtención de la muestra.

Se analizaron 15 pares de testículos de bovinos de las razas *Bos Indicus*, se dividen en 3 grupos con 5 pares de testículos seleccionados por conveniencia. Grupo A: técnica de obtención por compresión que consiste en realizar una presión con los dedos sobre las paredes de la cola del epidídimo y la porción libre del conducto deferente, luego con una jeringa de insulina se recupera el material de color blanco lechoso.

Grupo B: técnica de obtención por lavado retrógrado que consiste en colocar un catéter # 20 por la porción libre del conducto deferente y luego introducir 2 ml de solución isotónica de forma continua y por la sección cortada de la cola del epidídimo se recupera el material a través de una jeringa de insulina.

El Grupo C: técnica de obtención de aspirado con aguja fina que consiste en introducir una aguja calibre 21 y con la jeringa generar succión sobre las paredes del epidídimo. Estos métodos han sido descritos, como los más adecuados por producir un menor daño sobre las células espermáticas (Barrios, 2002) y un gran volumen de semen epididimal. Una vez se ha determinado la técnica más eficiente se inicia el proceso de obtención de muestras para ser evaluadas por intervalos de tiempo, comparando las variables ambiente y conservación a 5 °C con el fin de determinar los objetivos planteados en este trabajo.

### **Manejo de las muestras en el laboratorio**

Los testículos recolectados en las haciendas, una vez castrados los animales se almacenan en bolsas *zip-lock* y son marcados con un número arábigo. Luego, por selección aleatoria se distribuyen en dos cavas de icopor, la cava A se encuentra a temperatura ambiente y la cava B contiene hielo para reducir la temperatura y conservar la muestra a 5 °C.

Se obtienen 77 pares de testículos de bovinos de las razas *Bos Indicus*, estas muestras, una vez llegan al laboratorio, se retiran de las cavas A y B, y se acomodan los de la cava A en una mesa seca, dentro de las bolsas, protegidos de la luz solar, y los testículos contenidos en la cava B son almacenados en refrigerador que conserva la temperatura a 5 °C. Luego de retirar los testículos de las cavas se hace una evaluación a la hora 0 para establecer un patrón de cambios a través del tiempo por lo que se toma un volumen de 15 pares de testículos seleccionados de forma aleatoria. Y se continúa la evaluación y el comportamiento del semen epididimario a

las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 y 48 horas pos recolección en ambas variables de conservación.

Los testículos son lavados con solución salina para remover impurezas, luego son secados con toallas de papel, se incide la túnica vaginal parietal y visceral en la que se encuentra contenida la gónada, se expone y se separa de estas túnicas, luego se ubica la cola del epidídimo se disecciona del testículo separándolo del ligamento que los une, se realiza un corte transversal en la porción más caudal al cuerpo del epidídimo dejando la cola y el conducto deferente unidos, para luego obtener el semen por la mejor técnica descrita en el presente trabajo, el semen se va colectando de los epidídimos de acuerdo a los intervalos de tiempo establecidos.

### **Análisis y evaluación de la información**

Luego de ser obtenido el semen de origen epididimario se realiza una evaluación espermática convencional en microscopio a 10X y 40X, valorando volumen, motilidad individual, morfología espermática, e integridad. Luego, mediante cuadros comparativos se observan cambios en los tiempos de durabilidad y conservación del semen transcurrida la muerte. Para la evaluación de la técnica de recolección se realizó una prueba de comparación de medias mediante una prueba de Fisher con mínimas diferencias significativas (LSD), empleando un intervalo de confianza de 95%.

La evaluación del efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre las variables de respuesta, se realizó a través de un análisis de varianza (ANAVA) empleando un diseño multifactorial y mínimas diferencias significativas

(LSD), con el mismo intervalo de confianza (95%). Para el análisis de los resultados se empleó el software Statgraphics Centurion® XVI.I (Statpoint technologies, Inc. USA).

## Resultados

### Técnicas de recolección

La comparación de medias realizada sobre las técnicas de recolección evaluadas presentó diferencias estadísticas significativas sobre las variables respuesta % de daño y volumen espermático recuperado, con respecto a la técnica empleada ( $p=0,0000$ ). Las técnicas de recolección de compresión y lavado no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellas para ambas variables, considerándose un grupo homogéneo. La tabla 1 presenta el resumen de los datos obtenidos para cada una de las variables respuesta evaluadas frente a la técnica empleada.

**Tabla 1.** Comparación de las técnicas de recolección de semen para las variables Respuesta, Daño y Volumen recuperado<sup>1</sup>

Técnica	Daño (%)			Volumen recuperado (mL)		
	X±DS	Mínimo	Máximo	X±DS	Mínimo	Máximo
<b>Aspirado</b>	70,92±7,32 <sup>a</sup>	66,1148	75,7252	0,604±0,0573 <sup>a</sup>	0,566896	0,641104
<b>Compresión</b>	31,64±2,69 <sup>b</sup>	26,8348	36,4452	0,398±0,0248 <sup>b</sup>	0,360896	0,435104
<b>Lavado</b>	30,14±3,43 <sup>b</sup>	25,3348	34,9452	0,400±0,0212 <sup>b</sup>	0,362896	0,437104

La técnica más deficiente fue la de aspiración, asociada a los valores más altos de daño, a pesar del alto volumen espermático recuperado. Dado que las técnicas de

<sup>1</sup> X±DS: promedio datos ± desviación estándar.

<sup>a, b</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

lavado y compresión no presentaron diferencias estadísticas significativas, se eligió la técnica de compresión para la continuidad del estudio, por su facilidad de manejo y mínimo costo.

### **Evaluación de la temperatura de almacenamiento**

El ANAVA reportó diferencias estadísticas altamente significativas con respecto a los factores Temperatura (refrigeración y ambiente) y Tiempo de almacenamiento (hora) y sus interacciones para las variables respuesta Volumen, Movilidad, Velocidad, y Normalidad morfológica. Estos resultados indican el efecto que tienen la hora de la colecta, la temperatura de almacenamiento y la interacción de ambos factores (hora de colecta y temperatura) sobre la viabilidad y la calidad espermática de los recolectados. La tabla 2 presenta el resumen de los efectos principales (valores p) obtenidos para cada una de las variables respuesta en función de los factores evaluados (A, B) y sus interacciones (AB).

**Tabla 2.** Valores p obtenidos por efecto de los tratamientos y sus interacciones sobre las variables respuesta

<b>Variable respuesta</b>	<b>T° almacenamiento (A)</b>	<b>Tiempo (Hora) (B)</b>	<b>Interacción (AB)</b>
<b>Volumen (mL)</b>	0,0000	0,0000	0,0000
<b>Movilidad (%)</b>	0,0000	0,0000	0,0000
<b>Motilidad (%)</b>	0,0000	0,0000	0,0000
<b>Velocidad (%)</b>	0,0000	0,0000	0,0000
<b>Normalidad morfológica (%)</b>	0,0000	0,0000	0,0000

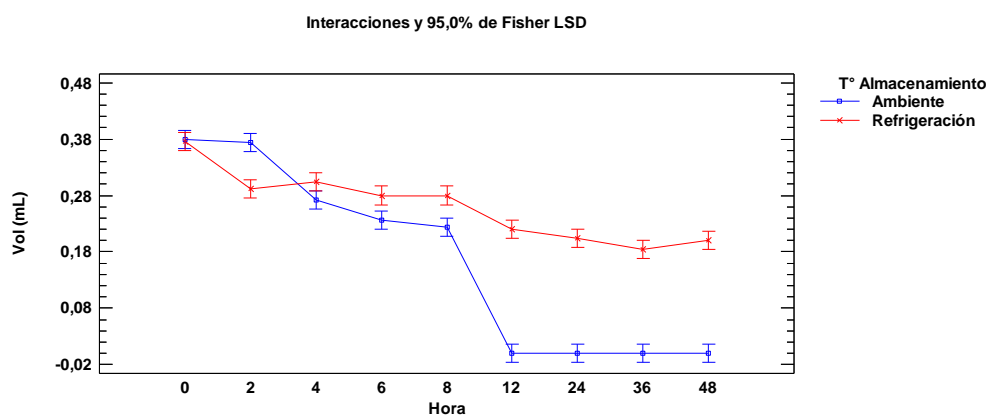
La tabla 3 presenta el resumen de los promedios y la desviación estándar en función de los factores evaluados para las variables dependientes volumen, motilidad y movilidad. Las otras variables respuesta no poseen desviación estándar al ser expresadas como variables restringidas, es decir, expresión de  $\geq$  o  $\leq$ .

**Tabla 3.** Promedio y desviación estándar especificados para las variables Volumen y Motilidad en función de cada tratamiento evaluado

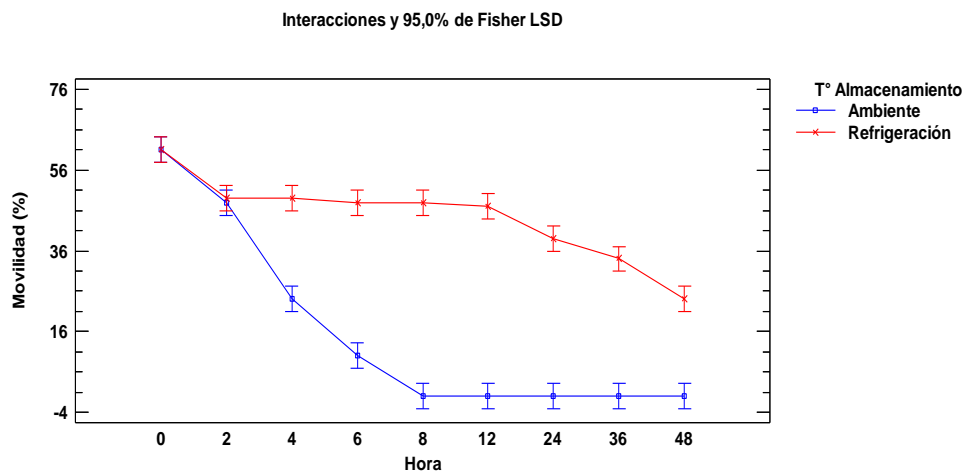
<b>Tratamiento</b>	<b>Promedio Volumen</b>	<b>Desviación estándar Volumen</b>	<b>Promedio Motilidad</b>	<b>Desviación estándar Motilidad</b>	<b>Promedio Movilidad</b>	<b>Desviación estándar Movilidad</b>
Amb hora 0	0,38	0,04123106	70,60	3,71483512	61,00	0
Amb hora 2	0,374	0,0167332	50,00	0	48,72	2,738612788
Amb hora 4	0,272	0,02167948	20,00	0	24,00	5,477225575
Amb hora 6	0,236	0,03507136	10,00	0	10,00	0
Amb hora 8	0,236	0,03507136	10,00	0	10,00	0
Refr hora 0	0,376	0,0181659	71,80	0	61,00	0
Refr hora 2	0,292	0,01095445	50,00	0	49,00	2,236067977
Refr hora 4	0,304	0,0167332	49,00	2,23606798	49,00	2,236067977
Refr hora 6	0,28	0,02738613	48,00	2,73861279	48,00	2,738612788
Refr hora 8	0,28	0,02738613	48,00	2,73861279	42,00	2,738612788
Refr hora 12	0,22	0,02738613	38,00	4,47213595	47,00	2,738612788
Refr hora 24	0,204	0,0928901	36,00	18,3549656	39,00	4,183300133
Refr hora 36	0,184	0,0167332	16,00	4,18330013	34,00	8,94427191
Refr hora 48	0,2	0,05	0,00	0	24,00	16,73320053

Las figuras 7, 8, 9, 10 y 11 presentan el volumen espermático, la movilidad, la motilidad, la velocidad, y la normalidad morfológica de los espermatozoides en función del tiempo y tipo de almacenamiento, respectivamente. Estos resultados muestran un efecto deteriorativo sobre la calidad espermática con el aumento del tiempo de la colecta, el mantenimiento a temperatura ambiental y la interacción de ambos factores, disminuyendo drásticamente la normalidad, la velocidad, la movilidad y el volumen, tras el paso de 8 horas de almacenamiento a temperatura ambiente para la recolección.

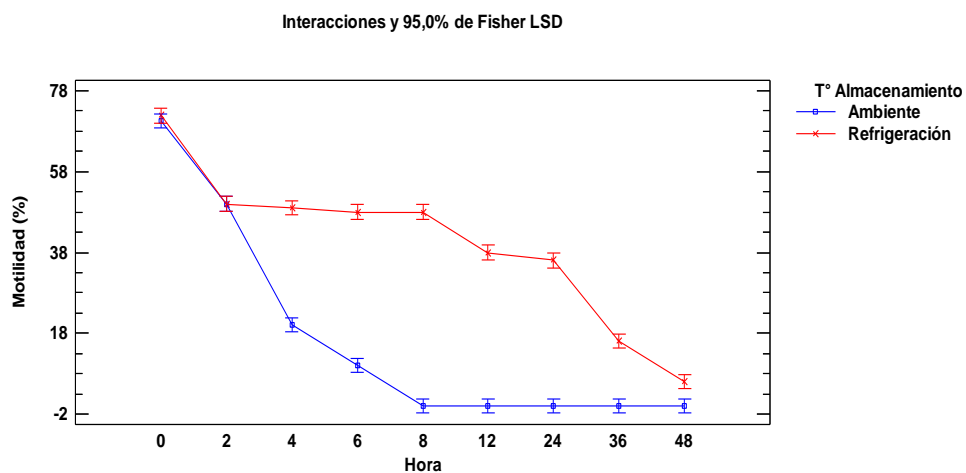
**Figura 7.** Promedio  $\pm$  desviación estándar del volumen espermático obtenido en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.



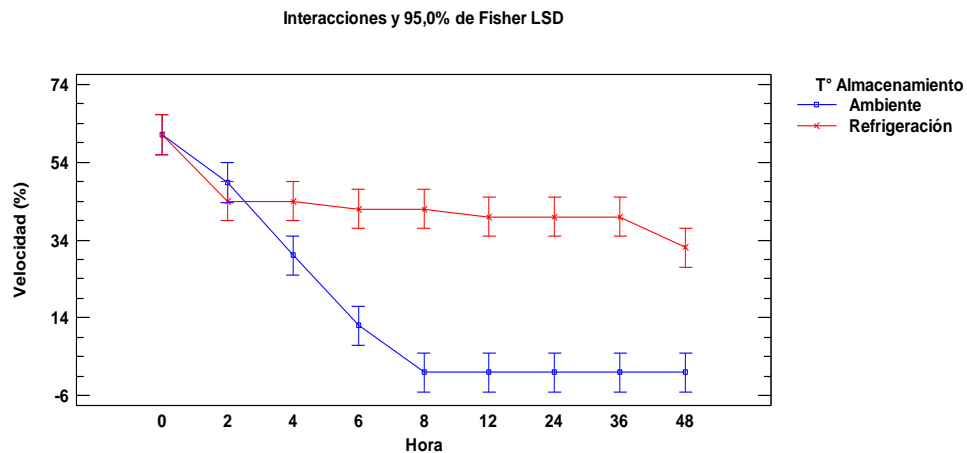
**Figura 8.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de la movilidad obtenida en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.



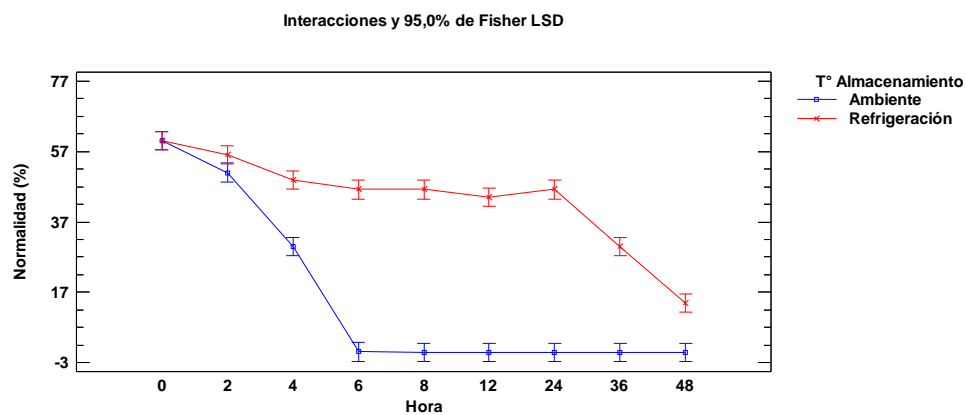
**Figura 9.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de la motilidad obtenida en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.



**Figura 10.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de la velocidad obtenida en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.



**Figura 11.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de la normalidad morfológica de los espermatozoides en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento



## Discusión

La cola del epidídimo es el principal punto de almacenamiento de los espermatozoides antes de ser eyaculados, así se logra la conservación y viabilidad por varias semanas (Reyes-Moreno et al., 2002), la cola es capaz de acumular un número alto de espermatozoides para varias eyaculaciones (Sostaric et al., 2008), lo que permite rescatar el material genético de animales de gran valor

En el presente estudio fueron utilizados bovinos provenientes de planta frigorífica y haciendas destinadas a la producción de tipo comercial, donde la calidad reproductiva no es un índice de evaluación, optándose por la utilización de la edad y el peso promedio ya que de acuerdo con Barrios (2002) el volumen seminal aumenta. Se puede apreciar que para la variable volumen la obtención promedio por la técnica de compresión y lavado retrógrado fue de 0.36 ml de semen epididimal, resultando inferior al que reporta Albbbers (2006) donde obtuvo un valor de 0.5 ml en fresco, pero Victoria et al. (2009) encontraron valores similares de 0.36 ml de obtención en fresco, por lo que no se encuentra una reducción significativa y se daría como un valor estándar. Pero si el volumen disminuye con respecto al pasar del tiempo, llegando a las 48 horas conservado a 5 °C un máximo de obtención 0.2 ml. Al evaluar el semen en fresco se encuentra un promedio del 72% de motilidad, un valor asemejado y sin cambios reportados por Galarza et al., (2015), y Ribeiro-Pérez et al. (2014). Pero sí se encuentra un aumento en la cantidad de anomalías de un 50% en el análisis de la morfología con respecto a los estudios de Saavedra et al. (2012), que presenta un porcentaje menor del 30% en fresco.

Con relación al tiempo en los intervalos de 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas en la variable de almacenamiento a 5 °C se encuentra una constante de conservación y disminución progresiva en la motilidad espermática, movilidad, y morfología celular, que se puede dar por la no agregación de criopreservantes y la muerte celular, siendo concordante con los estudios realizados por Saavedra et al. (2012) y Melo et al. (2008). Resulta viable preservar la cola del epidídimo durante un prolongado tiempo hasta llegar a ser congelado en pajillas. Las diferencias significativas en las variables de conservación a temperatura ambiente y a 5 °C fueron siempre entre ambas y no sobre los animales, por lo que se puede encontrar homogeneidad en el grupo. La observación sobre la edad y el peso con respecto al volumen de obtención, no presentan variación significativa. Pero sí se encuentra diferencia con los datos dados por Victoria et al. (2009), donde la viabilidad del material, una vez ha sido diluido y conservado a 5 °C durante 24 horas con medición en iguales intervalos a los estudiados en este trabajo, dan reportes de un 4% menos.

Con relación al semen almacenado dentro del epidídimo, manteniendo la constante de conservación a temperatura de 5 °C, se puede preservar el material genético por un tiempo de 48 horas con una motilidad espermática menor o igual al 10% resultando un valor inferior a lo reportado por Martins et al. (2009) que describen una motilidad del 24% hasta un máximo de 72 horas, la temperatura juega un papel importante en el retraso del metabolismo espermático lo que permite la viabilidad y durabilidad en el tiempo, conservar el genoma dentro del epidídimo resulta importante ya que se garantiza las condiciones fisiológicas naturales.

La variable de conservación a temperatura ambiente posee un tiempo máximo de durabilidad y viabilidad espermática hasta de 8 horas post sacrificio, con una pérdida en la motilidad y la movilidad espermática, siendo similar a los reportes dados por Martins et al. (2009), al morir un animal se puede dar la tendencia a recuperar los testículos, lavarlos y almacenarlos en refrigeración para luego criopreservar el material y utilizarlo en biotecnologías de la reproducción de forma asistida.

## Conclusiones

El método por compresión y el de lavado retrógrado resultan ser útiles y compatibles en la obtención de las muestras, no son difíciles de aplicar y causan el menor daño al material genético.

La técnica por compresión es fácil de trabajar, consiste en generar presión sobre las paredes del conducto hacia la sección cortada del epidídimo, observándose un material de color lechoso compatible con semen. Este material una vez ha sido obtenido debe ser inmediatamente diluido en medios de conservación que garanticen la sobrevivencia de los espermatozoides, debido a los cambios naturales en el proceso de degradación y descomposición, el pH desciende rápidamente y no permite la viabilidad del semen por más de 8 horas una vez este ha sido extraído de la cola del epidídimo. El tiempo a su vez juega un papel importante a medida que transcurre, los conductos pierden elasticidad, se tornan rígidos y el volumen máximo de colecta no supera los 0,25 ml por conducto.

Con el tiempo se ha presentado la necesidad de buscar nuevas técnicas de conservación genética. Obtener semen epididimal de animales muertos es posible y más aún cuando los animales de gran potencial no han sido colectados, existe, eso sí, una sobrevivencia máxima de 8 horas a temperatura ambiente dentro de la estructura testicular y de 48 horas después de muerto conservado a una temperatura de 5 °C dentro de los testículos.

Al disminuir la motilidad espermática el semen pierde en gran medida la movilidad y por ende la capacidad de fecundar por sí solo, lo que permite usarlo en

otros métodos de biotecnología de la reproducción como la fertilización invitro e intraoocitaria.

Cuando un animal de alto valor genético ha presentado un inconveniente y por sí solo ya no puede transmitir sus genes, se pueden recuperar los testículos con 2/3 partes del cordón espermático, luego deben ser almacenados en una bolsa *zip-lock* alejándolo de posibles contaminantes que se encuentran en el aire, se deben llevar a una nevera que conserve la temperatura de forma estable a 5 °C hasta por un tiempo máximo de 48 horas, lo que permite el desplazamiento con este material desde los lugares más lejanos hasta llegar a centros especializados en reproducción, donde posteriormente podrán congelar una gran cantidad de pajuelas y poder utilizar el genoma de estos ejemplares. La morfología de las células espermáticas presenta principalmente restos de gota citoplasmática distal, resultado del último proceso de maduración que se da antes de ser eyaculados. Este proceso no afecta en gran medida la viabilidad y el uso de espermatozoides de origen epididimal.

Encontramos en el presente estudio la capacidad de obtener material genético y hacerlo viable bajo las nuevas tendencias de la biotecnología de la reproducción, lo que garantiza incrementar exponencialmente el número de animales mejorados genéticamente a partir de animales que contienen un número de patrones de ganancia, hoy en día se buscan animales con índices mejorados de acuerdo al modelo de producción al cual se encuentra enfocado, sea leche, carne, doble propósito, y vientres de cría.

## Referencias

- Albers Álvarez, M.; Barrios Arismendi, D. (2006). Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros post mortem obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Tropical*, 24 (3), 267-280.
- Busch, W. y Waberski, D. (2010). *Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica*. Zaragoza: Acribia.
- Galarza, D. A.; Serpa, V.G.; Torres, C. & Iñiguez, C. U. (2015). *Evaluación de la calidad y la congelabilidad de espermatozoides epididimarios provenientes de toros faenados en el camal de Cuenca, Ecuador*. En Primer Congreso Internacional sobre Producción Animal Especializada en Bovinos, Cuenca, Ecuador.
- Garner, D. L. y Hafez, E. S. E. (2002). Espermatozoides y plasma seminal. En E. S. E. Hafez (ed.). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (pp. 98-112). México: McGraw-Hill.
- Hafez, E. S. E. (2002). Anatomía del aparato reproductor del macho. En E. S. E. Hafez (ed.). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (pp. 3-12). México: McGraw-Hill.
- Martins, C. F.; Driessen, K.; Costa, P. M.; Carvalho-Neto, J. O.; de Sousa, R. V.; Rumpf, R. & Dode, M. (2009). Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*, 116 (1-2), 50-57.
- Melo, C. M., Papa, F. O.; Fioratti, E. G.; Villaverde, A. I.; Avanzi, B. R.; Monteiro, G.,... Alvarenga, M. A. (2008). Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 107 (3-4), 331.

- Reyes-Moreno, C.; Boilard, M., Sullivan, R. & Sirard, M. (2002). Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biology of Reproduction*, 66 (1), 159-166.
- Ribeiro-Peres, A.; Munita-Barbosa, L.; Yumi-Kanazawa, M.; Mello-Martins, M. & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46 (1), 31-38.
- Saavedra, G. D.; Mas, A.; Sanes, J. M., Vallejo, P.; Matas, C. & Seva, J. (2012). Parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos post mortem en el toro de lidia. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 28, 7-13.
- Sánchez Israel, V.; Erosa D.; Pérez Lugo, P. et al. (2009). Efecto de la adición de plasma seminal ovino sobre la sobrevivencia de espermatozoides epididimales en toros de lidia. Subdirección de coordinación de enlace operativo. Mérida, Yucatán.
- Sánchez Israel, V.; Aguiar Loria, A.; Erosa, S.; Cervera, D.; Avilés Ávila, V.; Navarrete Sierra, L.,... Ramón Ugalde, L. (2009). *Congelación post mortem de semen de toro lidiado*. Centro Etnográfico y Bibliográfico virtual del toro de lidia. Recuperado de:[http://www.cetnotorolidia.es/opencms\\_wf/opencms/system/modules/es.jcyl.ita.site.torodelidia/elements/galleries/galeria\\_downloads/CONGELACION\\_POSTMORTEM\\_DE\\_SEMEN\\_DE\\_TORO\\_LIDIADO\\_RMCA\\_2010.pdf](http://www.cetnotorolidia.es/opencms_wf/opencms/system/modules/es.jcyl.ita.site.torodelidia/elements/galleries/galeria_downloads/CONGELACION_POSTMORTEM_DE_SEMEN_DE_TORO_LIDIADO_RMCA_2010.pdf)
- Sostaric, E.; Aalberts, M.; Gadella, B. M. & Stout, T. A. (2008). The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 107 (3-4), 237-248.