

*Título* **EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CAPACIDAD  
FECUNDANTE DE ESPERMATOZOIDES DE LA COLA  
DEL EPIDÍDIMO DE TOROS POST-MORTEM**

*Autor* **Dr. Diego R. Barrios A.**  
*Post-grado de Reproducción Animal Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central  
de Venezuela*  
*[dbarrios29@hotmail.com](mailto:dbarrios29@hotmail.com)*  
*Celular: 0414-3-45.36.69*

*Español*

**INTRODUCCIÓN.**

La criopreservación de espermatozoides bovinos para su uso en inseminación artificial es una tecnología que ha logrado grandes progresos en el campo de la reproducción y en el mejoramiento genético poblacional.

La recolección de semen de toros por métodos convencionales, como la vagina artificial y el electroeyaculador, ha permitido el establecimiento de bancos de germoplasma provenientes de machos reproductores seleccionados.

Por otro lado, es importante establecer un método que permita recolectar espermatozoides de toros élitos que hayan muerto repentinamente, de manera tal de poder obtener descendencia de esos toros, mediante la inseminación artificial o la fertilización *in vitro*. Así que podría implementarse la recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo para propagar la calidad genética de toros *post-mortem*, puesto que los espermatozoides que se encuentran allí, según se ha reportado (Chung, 1997; Reyes Moreno *et al.*, 2000; Reyes Moreno *et al.*, 2002), tienen capacidad fertilizante.

El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones, almacenamiento y maduración espermática. La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo, y la de almacén de los espermatozoides maduros en la cola del epidídimo (Amann y Schanbacher, 1983). Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo que tengan motilidad y capacidad de fertilizar, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser congelados para su posterior uso en inseminación artificial.

Hasta el presente no se ha reportado en la literatura científica el nacimiento de becerros originados de espermatozoides frescos o congelados recolectados de la cola del epidídimo de toros; aunque ha habido algunos avances con espermatozoides bovinos epididimarios usados en fresco para fertilización *in vitro* (Chung, 1997), y en la congelación de espermatozoides de la cola del epidídimo de ratas (Nakatsukasa *et al.*, 2001), ungulados salvajes (Perez y De la Fuente, INIA, Madrid), caninos (Hewitt *et al.*, 2001) y felinos (Axné, *et al.*, 1999).

En consecuencia, hemos establecido como propósito de esta línea de investigación la obtención de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros recién muertos, para evaluar su capacidad fertilizante.

## Fisiología y Reproducción

---

### OBJETIVOS

#### - OBJETIVO GENERAL:

Evaluar de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides recolectados por tres protocolos distintos de la cola del epidídimo de toros postmortem.

#### - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Establecer el método más eficiente de recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo. Para tal efecto se compararán tres métodos: la perfusión de la cola del epidídimo, el desmenuzamiento de la cola del epidídimo, y un método mixto que combina los dos anteriores.

Evaluar la calidad de los espermatozoides de la cola del epidídimo según los parámetros convencionales de movilidad individual. Vitalidad, concentración y morfología espermática.

Evaluar la capacidad fertilizante de los espermatozoides epididimarios en fresco, mediante la inseminación artificial de hembras bovinas.

Establecer un protocolo de congelación que mantenga la viabilidad de los espermatozoides post-congelación.

Evaluar el efecto del lapso de tiempo transcurrido desde la recolección de los testículos en el matadero, hasta la obtención de los espermatozoides epididimarios.

Evaluar la histología del testículo y el epidídimo, para descartar posibles alteraciones morfológicas que pudieran influir sobre la calidad espermática.

Evaluar el uso del diluyente TRIS-YEMA (o GLICEROL o TRILADYL) en la congelación de los espermatozoides recolectados, y un protocolo de congelación.

### HIPÓTESIS:

La recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem es una alternativa factible que permite obtener espermatozoides fertilizantes y eventualmente la propagación de la calidad genética de esos toros.

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1. EL TESTÍCULO

##### 1.1 ANATOMÍA DEL TESTÍCULO

Los testículos son las gónadas masculinas y están contenidos en una bolsa de piel especializada denominada *escroto* (Sisson, 1975), que protege y soporta a los testículos. La función principal del escroto es regular la temperatura interna de las gónadas mediante la contracción involuntaria del músculo *dartos*, que recubre el escroto interna y basalmente (Salisbury *et al.*, 1978).

Los testículos están recubiertos por dos capas serosas de la túnica *vaginalis*, y una capa de tejido conectivo denso e irregular, que constituye la túnica *albugínea* (Wrobel y Dellmann, 1993). De la túnica albugínea emergen trabéculas de tejido conectivo que convergen en el mediastino ubicado en el centro del parénquima testicular, y dividen al testículo en un número variable de *lobulillos testiculares* que contienen de 1 a 4 *túbulos seminíferos* contorneados

## Conferencia (Continuación)

# Fisiología y Reproducción

---

Los túbulos seminíferos se unen, a la salida de cada lobulillo, y forman los túbulos rectos agrupados en el mediastino, que a su vez conforman la rete testis (Sisson, 1975). De la rete testis sale una docena de túbulos llamados vasos eferentes que convergen en la porción dorsal del mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo (Salisbury *et al.*, 1978).

### 1.2. COMPARTIMIENTOS TESTICULARES:

El testículo tiene tres compartimientos funcionales (Amann y Schanbacher, 1983):

- a) El compartimiento intersticial, contiene las células de Leydig (que rodean cada túbulo seminífero y lo bañan con un fluido rico en testosterona) y vasos sanguíneos y linfáticos;
- b) El compartimiento basal (separado del anterior por la lámina propia testicular), que incluye la base de las células de Sertoli (células de sostén), y las espermatogonias (células espermáticas precursoras, que se dividirán por mitosis); y
- c) El compartimiento adluminal, que incluye la porción apical de las células de Sertoli, y los espermatoцитos y espermátides. Aquí ocurre la espermiogénesis (diferenciación de las espermátides a espermatozoides) (Johnson y Everitt, 1980; Amann y Schanbacher, 1983).

El compartimiento basal y el compartimiento adluminal están separados fisiológicamente en el animal adulto por la “barrera hemotesticular” conformada por “uniones gap” entre las células de Sertoli (Jonson y Everitt, 1980; Chenoweth, 1997). Esta barrera afecta el libre intercambio de sustancias hidrosolubles, por lo cual la composición del fluido que se encuentra dentro del túbulo seminífero es diferente al fluido extratubular (Jonson y Everitt, 1980).

### 1.3. FUNCIÓN TESTICULAR:

El testículo tiene dos funciones principales que son: a) la esteroidogénesis o secreción de hormonas masculinas, como la testosterona y androstenediona a través del proceso de esteroidogénesis, en las células de Leydig (Salisbury *et al.*, 1978; Amann y Schanbacher, 1983; Chenoweth, 1997); y b) la gametogénesis o producción de espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis, en los túbulos seminíferos (Amann y Schanbacher, 1983; Chenoweth, 1997).

#### 1.3.1. ESTEROIDOGÉNESIS:

Las células de Leydig producen hormonas masculinas como respuesta a su estimulación por parte de la hormona luteinizante (LH), liberada por la hipófisis, a su vez estimulada por la GnRH secretada por el hipotálamo (Chenoweth, 1997). La testosterona producida por las células de Leydig es necesaria, entre otras cosas, para la función de las células de Sertoli y la producción de espermatozoides (Maddocks *et al.*, 1995; Chenoweth, 1997).

Las células de Leydig se localizan en el tejido intersticial en estrecha aposición con los vasos sanguíneos y linfáticos. Son células poliédricas cuyo citoplasma contiene numerosas vacuolas lipídicas y abundante retículo endoplásmico liso (Chenoweth, 1997). Los productos de secreción de estas células son los andrógenos, más la inhibina, la activina y el “factor de crecimiento parecido a insulina” o IGF-I (Maddocks *et al.*, 1995).

---

*Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem 1*

## Conferencia (Continuación)

# Fisiología y Reproducción

---

La producción de esteroides está directamente relacionada con la cantidad de retículo endoplásmico liso presente en la célula de Leydig, ya que allí se produce colesterol a partir del acetato y se almacena libre o en compuestos esterificados (Ganong, 1990). La formación de pregnenolona ocurre en las mitocondrias como consecuencia de la escisión enzimática del colesterol, y pasa al retículo endoplásmico liso donde es rápidamente metabolizada a testosterona a través de la ruta intermediaria D<sub>4</sub> y D<sub>5</sub> por la 3 $\beta$ -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (Johnson y Everitt, 1980; Amann y Schanbacher, 1983).

La secreción de testosterona está controlada por la LH, y el mecanismo por el cual ésta estimula las células de Leydig incluye un incremento en la formación de cAMP o AMP cíclico (Ganong, 1990).

La actividad esteroidogénica de las células de Leydig es inhibida por: a) estrógenos producidos en la célula de Sertoli; b) un factor parecido a GnRH, que ha sido reportado en el testículo y en cultivo de dichas células (Risbridger y De Kretser, 1989, citado por Maddocks *et al.*, 1995); y c) el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) (Hsueh *et al.*, 1987, citado por Maddocks *et al.*, 1995).

Los "factores de crecimiento parecidos a insulina" (IGF-I e IGF-II), y la inhibina estimulan la esteroidogénesis inducida por la LH (De Mellow *et al.*, 1987, citado por Maddocks *et al.*, 1995). Además se ha demostrado que la presencia de macrófagos testiculares estimulan la actividad esteroidogénica en las células de Leydig *in vitro* (Yee y Hutson, 1985, citado por Maddocks *et al.*, 1995).

### 1.3.2. ESPERMATOGÉNESIS:

La espermatogénesis es la suma de las divisiones mitóticas y meióticas de células espermáticas precursoras, que ocurren dentro del túbulo seminífero y resultan en la formación de los espermatozoides (Chenoweth, 1997) y se inicia a partir de la pubertad (Salisbury *et al.*, 1978). El ciclo de la espermatogénesis en el toro adulto dura aproximadamente 61 días (Chenoweth, 1997).

Este proceso se lleva a cabo en los compartimientos basal y adluminal del túbulo seminífero, separados funcionalmente entre sí por las células de Sertoli, que garantizan el ambiente propicio para que se lleve a cabo la espermatogénesis (Maddocks *et al.*, 1995).

Las células de Sertoli están sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos y representan el 25% del epitelio tubular. No se dividen después de la pubertad y mantienen contacto entre las células vecinas (Johnson y Everitt, 1980; Maddocks *et al.*, 1995) y las células germinales en desarrollo (Chenoweth, 1997). Así tenemos que las espermatogonias se ubican entre las células de Sertoli y la membrana basal del túbulo y otras están en las criptas intercitoplasmáticas de las células de Sertoli (Griswold, 1995).

Las células de Sertoli responden a la FSH regulando el número de espermatogonias que entran en el proceso de división celular (Griswold, 1995; Maddocks *et al.*, 1995) y juegan un papel importante en la elongación nuclear y en la formación del acrosoma en las espermátides (Chenoweth, 1997). Bajo la acción de la FSH las células de Sertoli secretan glicoproteínas como transferrina, ceruloplasmina, inhibina, y proteína transportadora de andrógeno ABP (Griswold, 1995).

---

*Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem 2*

## Conferencia (Continuación)

# Fisiología y Reproducción

---

La espermatogénesis incluye dos fases: a) la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren división celular hasta transformarse en espermátides y b) la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez, 1986).

Las espermatogonias contienen el número de cromosomas característico de la célula somática de la especie (60 cromosomas en el bovino) y están categorizadas en: a) espermatogonia tipo A, que incluye espermatogonias A1 y formas celulares más diferenciadas llamadas espermatogonias A2, A3, A4; b) espermatogonia intermedia o "In", derivada de A4; y c) espermatogonia tipo B, que incluye B1 y B2 (Salisbury *et al.*, 1978, Ekstedt *et al.*, 1986; Hafez, 1989).

La espermatogonia es una célula diploide (Wrobel, 1993) que se divide mitóticamente sólo para formar otra espermatogonia, excepto la espermatogonia tipo B2, que se divide para formar dos espermatocitos primarios (Amann y Schanbacher, 1983; Ekstedt *et al.*, 1986; Chenoweth, 1997). Deben ocurrir seis divisiones mitóticas para que se originen las espermatogonias "In" (Ekstedt *et al.*, 1986). Por esta razón siempre habrá una cohorte de espermatogonias proliferativas A que se dividirán en tipos A y B para reemplazar a las tipo B que se dividieron anteriormente (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997).

Luego del crecimiento y desarrollo de los espermatocitos primarios siguen dos divisiones celulares. De la primera división se producen dos espermatocitos secundarios de cada uno de los espermatocitos primarios; y de la segunda división se producen dos espermátides de cada espermatocito secundario (Salisbury *et al.*, 1978; Ekstedt *et al.*, 1986).

Durante la espermiogénesis ocurren cambios morfológicos como la formación del acrosoma, la condensación de la cromatina nuclear, el desarrollo de la cola, y la pérdida del "Cuerpo Residual de Regaud" (sobrante de la espermátide que no es necesario para el espermatozoide maduro) (Wrobel y Dellman, 1993). La espermiogénesis ha sido dividida en fase de Golgi, fase de capuchón, fase del acrosoma y fase de maduración (Ekstedt *et al.*, 1986; Hafez, 1989; Wrobel y Dellman, 1993).

El control hormonal de la espermatogénesis en toros adultos está dado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, a través del cual la GnRH secretada por el hipotálamo regula la liberación de LH y FSH. La LH es liberada en 3-4 episodios diarios que persisten por aproximadamente 1.5 horas y tiene una acción indirecta sobre la espermatogénesis a través de la estimulación de la producción de testosterona por las células de Leydig; y la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la espermiogénesis (Amann, 1983). A su vez, la testosterona es necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis y ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Amann, 1983; Ekstedt *et al.*, 1986).

La espermatogénesis puede ser afectada por diversos factores. Así tenemos que es afectada negativamente por el incremento de la temperatura escrotal que puede ocurrir por procesos de inflamación, fiebre, o temperatura ambiental muy elevada. Cuando se afecta la espermatogénesis todos los estadios de espermatogonias mueren, las espermátides sufren anomalías estructurales y metabólicas, disminuye la proporción de espermatozoides vivos y progresivos móviles, y se incrementan las atipias por defectos de cabeza principalmente (Kastelic, 1997; Setchell, 1998).

## Fisiología y Reproducción

---

Por otro lado, algunas afecciones congénitas o adquiridas pueden influir en el proceso espermatogénico, tales como la aplasia segmental del epidídimo, y también casos de epididimitis, hiperplasia epitelial, criptorquidismo, hernia inguinal, y varicocele se han asociado a cuadros de subfertilidad en el toro (Van Camp, 1997). Otros factores que influyen negativamente sobre la espermatogénesis son aquellas enfermedades que cursan con cuadros clínicos sistémicos, deficiencias nutricionales, y también el daño químico asociado a algunos agentes terapéuticos (Rodel, 1995).

### 2. EL EPIDÍDIMO

#### 2.1 ANATOMÍA DEL EPIDIDIMO

El epidídimo es un túbulo elongado y tortuoso empaquetado en un saco de tejido conectivo que es una extensión de la túnica albugínea y mide alrededor de 30-35 metros de largo en el toro (Salisbury *et al.*, 1978; Chenoweth, 1997).

Anatómicamente el epidídimo consta de tres partes bien definidas: cabeza, cuerpo y cola (Sisson, 1975; Chenoweth, 1997). La cabeza es la parte más grande, recorre el polo dorsal del testículo y desciende en forma de asa unos 2.5-3 cm de la superficie dorso lateral del testículo. El cuerpo del epidídimo se extiende hacia el polo distal del testículo como una banda de 1 cm de ancho y se une íntimamente a la cara caudo-medial del testículo. La cola del epidídimo tiene forma cónica y se une estrechamente por su base mayor al polo distal del testículo. (Zemjanis, 1994).

Las convoluciones del epidídimo van disminuyendo en amplitud progresivamente desde la cabeza al cuerpo, en el cual se aprecia una constricción delgada de la túnica albugínea; pero a nivel de la cola aumentan el diámetro del túbulo y el tamaño de las convoluciones (Salisbury *et al.*, 1978).

#### 2.2. FUNCIÓN DEL EPIDÍDIMO

Las funciones del epidídimo son el transporte y la maduración de los espermatozoides (Chenoweth, 1997), los cuales, a través del pasaje por los conductos eferentes y el epidídimo, adquieren la habilidad de tener movimiento progresivo lineal y la capacidad de fertilizar (Johnson y Everitt, 1980). Durante este proceso, en la célula espermática ocurren cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos (Johnson y Everitt, 1980; Amann y Schanbacher, 1983; Chenoweth, 1997). También ocurre la reabsorción e intercambio de fluidos (Salisbury *et al.*, 1978). Específicamente, en la cabeza del epidídimo ocurre la reabsorción de solutos y fluidos, en el cuerpo del epidídimo la maduración espermática, y en la cola del epidídimo el almacenamiento de los espermatozoides fértiles (Amann y Schanbacher, 1983).

En su origen los espermatozoides son incapaces de moverse, de allí que el transporte inicial a la *rete testis* es dependiente del fluido secretado por las células de Sertoli. En los conductos eferentes, cabeza y cuerpo del epidídimo el transporte es mediado por el epitelio del epidídimo, específicamente las células ciliadas y las principales, y contracciones peristálticas de la musculatura lisa de los conductos eferentes y la cabeza y cuerpo del epidídimo, más la presión hidrostática interna (Johnson y Everitt, 1980; Amann y Schanbacher, 1983; Chenoweth, 1997).

---

*Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem* 3

## Fisiología y Reproducción

Es importante puntualizar que los espermatozoides inmóviles que son transportados al lumen del túbulo seminífero, una vez separados de la célula de Sertoli, tienen una cantidad de citoplasma residual de las espermátides retenida por las células de Sertoli, y otra porción se queda unida al espermatozoide emergente y forma la "gota citoplasmática" (Chenoweth, 1997).

El tiempo requerido para la movilización de los espermatozoides por la cabeza y el cuerpo del epidídimo no es afectado por la eyaculación frecuente; es decir toros que eyaculan diariamente o tres veces a la semana mantienen un tiempo promedio de trayecto que dura aproximadamente 2.5 días en el toro adulto (Amann y Schanbacher, 1983).

En cambio, en la cola del epidídimo los movimientos peristálticos son menos frecuentes y los conductos deferentes son inactivos, excepto cuando la musculatura es estimulada a contraerse (Amann y Schanbacher, 1983), por lo que el tránsito en esta porción del epidídimo sí es afectado por la eyaculación. El número de espermatozoides en la cola del epidídimo es máximo cuando los animales no han eyaculado en 7 días, pero se reduce en al menos 25% en animales que eyaculan diariamente o con un día de por medio (Pickett *et al.*, citado por Amann y Schanbacher, 1983).

Los espermatozoides son producidos continuamente a pesar de la eyaculación frecuente y entran al epidídimo a una tasa constante; sin embargo, si no son eyaculados, algunos son eliminados periódicamente con la orina (Amann y Schanbacher, 1983).

Un solo epidídimo tiene capacidad para almacenar 4 ml de fluido rico en espermatozoides, con una concentración de  $3.55 \times 10^9$  espermatozoides/ml, que ocupa la mitad del volumen total (Salisbury *et al.*, 1978). Se han reportado resultados variables en las concentraciones espermáticas de los dos epidídimos de toros adultos. Allí hay una concentración de 15 a  $40 \times 10^9$  espermatozoides/ml, suficientes para proveer 20 eyaculados normales consecutivos en un período de 3-4 horas (Salisbury *et al.*, 1978). En una revisión de literatura (Amann y Schanbacher, 1983) se demuestra que la cantidad de espermatozoides varía entre las porciones del epidídimo en diferentes razas de toros (tabla 1).

**TABLA 1. Concentración espermática en toros adultos**

RAZA	EPIDÍDIMO			CONDUCTO DEFERENTE Y AMPOLLA	TOTAL
	CABEZA	CUERPO	COLA		
Hereford	11	1	21	6	40
Charolais	18	4	35	7	64
Holstein	20	5	39	8	72

(Adaptado de Amann y Schanbacher, 1983).

El ambiente al que se enfrentan las células espermáticas al llegar al epidídimo es diferente al de los túbulos seminíferos y conductos eferentes. Tal diferencia se debe a los cambios en la composición del fluido drenado por la *rete testis*, debido a que la presencia de la barrera hemotesticular es incompleta en esta región (Johnson y Everitt, 1980).

*Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem* 4

## Fisiología y Reproducción

---

El ambiente al que se enfrentan las células espermáticas al llegar al epidídimo es diferente al de los túbulos seminíferos y conductos eferentes. Tal diferencia se debe a los cambios en la composición del fluido drenado por la *rete testis*, debido a que la presencia de la barrera hemotesticular es incompleta en esta región (Johnson y Everitt, 1980).

Además, en todo el trayecto del epidídimo hay células secretoras cuyas secreciones afectan a los espermatozoides (Amann y Schanbacher, 1983), y vale decir que la porción de la cabeza del epidídimo está revestida internamente por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado (Salisbury *et al.*, 1978).

El fluido producido por las células secretoras del epidídimo es rico en carnitina, glicerilfosforilcolina y varias glicoproteínas, y generalmente es de color amarillento (Johnson y Everitt, 1980), pero en toros fértiles adquiere apariencia blanco cremosa debido a la concentración de espermatozoides (Salisbury *et al.*, 1978).

La maduración espermática en el epidídimo es dependiente de las secreciones epiteliales, del transporte de sodio y potasio, de los andrógenos, y de la temperatura escrotal (Amann y Schanbacher, 1983). Los cambios estructurales de los espermatozoides se deben a la utilización de fosfolípidos y colesterol como sustratos durante la maduración en el epidídimo. En estos cambios se completa el proceso de condensación nuclear, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática, aumenta la negatividad de la carga superficial, y ocurren ligeros cambios en la morfología del acrosoma (Johnson y Everitt, 1980).

La testosterona ejerce influencia directa en la maduración espermática. En el epidídimo los receptores intracelulares captan andrógenos y la enzima 5 $\alpha$ -reductasa convierte la testosterona en dihidrotestosterona (Johnson y Everitt, 1980; Amann y Schanbacher, 1983). Si los andrógenos son removidos por castración, las secreciones cesan y el epidídimo involuciona. La inyección de testosterona restablece las secreciones (Johnson y Everitt, 1980).

En un estudio realizado en Venezuela (Rodríguez *et al.*, 2000) con toros mestizos (5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo) se demostró que el desarrollo y mantenimiento estructural y funcional de las células del epitelio, en la cabeza del epidídimo, dependen de la función testicular y por lo tanto de los andrógenos testiculares, pero en la cola del epidídimo los mismos aspectos dependen de los andrógenos sanguíneos.

### 3. MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula alargada especializada cuya única función es fertilizar al ovocito (Mc. Donald, 1991). En el bovino mide aproximadamente 75 micrones de largo y tiene una carga haploide de cromosomas (1n cromosoma) (Hafez, 1986). Está formada por tres componentes principales: cabeza, cuello y cola (Hafez, 1986; Mc. Donald, 1991).

La cabeza del espermatozoide contiene el material genético y mide 8-10 micrones de largo, 4-5 micrones de ancho y 0.5 micrones de grosor (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez, 1986; Mc. Donald, 1991).

## Conferencia (Continuación)

# Fisiología y Reproducción

---

En la cabeza del espermatozoide se encuentran el núcleo celular y el acrosoma. El núcleo es ovalado, aplanado, y la cromatina está compactada y conformada por ADN unido a histonas espermáticas (Salisbury *et al.*, 1978).

El acrosoma tiene forma de capuchón y cubre el polo anterior de la cabeza espermática (Salisbury *et al.*, 1978). En la región anterior tiene el cuerpo apical, y en la caudal tiene un estrechamiento que conforma el segmento ecuatorial, asociado a los procesos de envejecimiento celular (Salisbury *et al.*, 1978). Además, tiene una membrana acrosomal de doble pared, interna y externa, conectadas por puentes; dichas membranas se fusionan en su extremo caudal (Mc. Donald, 1991).

El acrosoma contiene varias enzimas hidrolíticas (acrosina, hialuronidasa, esterases e hidrolasas ácidas) que participan activamente en el proceso de la fecundación (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997). Entre el núcleo espermático y el acrosoma se encuentra la sustancia perinuclear (Mc. Donald, 1991). La base del núcleo está rodeada por la vaina post-acrosómica donde hay proteínas ricas en azufre y receptores moleculares que reconocen al ovocito durante la fecundación (Salisbury *et al.*, 1978).

El cuello del espermatozoide es una estructura corta (0.4-1.5 micrones de largo) ubicada entre la cabeza y la pieza intermedia. Tiene un centríolo rodeado de 9 fibras periféricas orientadas longitudinalmente que se continúan con las fibras exteriores de la pieza intermedia (Salisbury *et al.*, 1978).

La cola del espermatozoide está dividida en 3 partes bien diferenciadas: la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal (Mc. Donald, 1991). Con todos sus componentes mide 45-50 micrones de largo (Salisbury *et al.*, 1978).

La pieza media tiene 2 microtúbulos centrales y 9 dupletas periféricas que constituyen el filamento axial. Estas estructuras a su vez están rodeadas por 9 fibras exteriores orientadas longitudinalmente y conectadas a las fibras del cuello. Además, las mitocondrias dispuestas en patrón helicoidal conforman el aparato metabólico y rodean las 9 fibras exteriores (Mc. Donald, 1991). Un engrosamiento en forma de anillo señala el límite entre la pieza media y la pieza principal (Salisbury *et al.*, 1978).

La pieza principal es la porción más larga del flagelo, la estructura del filamento axial es idéntica a la estructura de la pieza media (Mc. Donald, 1991), e igualmente está rodeado por las fibras exteriores que son continuación de la pieza media (Hafez, 1989). Sin embargo, las fibras están sujetas a variaciones de tamaño y forma, y se van estrechando gradualmente hacia el final de la pieza principal (Salisbury *et al.*, 1978). La vaina fibrosa periférica es otra estructura de la pieza principal y se forma mediante la fusión de 2 fibras exteriores con bandas semicirculares de proteínas estructurales (Salisbury *et al.*, 1978).

La pieza terminal comienza donde finaliza la vaina fibrosa de la pieza principal. Contiene solamente el complejo del filamento axial, y los microtúbulos se reducen gradualmente en unidades que terminan en diferentes niveles (Salisbury *et al.*, 1978).

## Fisiología y Reproducción

---

### 3.1. ALTERACIONES DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA.

Las desviaciones morfológicas de la estructura normal del espermatozoide son consideradas anormales. Las anomalías espermáticas se han clasificado en primarias y secundarias (Spitzer, 2000; fuente Internet) según la estructura anatómica en la que se generan.

Las anomalías espermáticas primarias se originan dentro del testículo y se deben a fallas en la espermatogénesis (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997). Estas anomalías incluyen espermatozoides con escaso desarrollo, espermatozoides dobles y defectos de cabeza, entre ellos: protuberancia acrosómica, cabeza piriforme, cabeza estrecha o delgada, contorno rugoso de la cabeza, espermatozoides microcefálicos, y cabezas libres.

La mayoría de los defectos de la cola del espermatozoide también son considerados anomalías primarias, entre ellas están el defecto en la pieza media, "defecto dag", presencia de gota citoplasmática proximal, cola fuertemente enrollada, y colas accesorias (Chenoweth, 1997).

Las anomalías espermáticas secundarias son aquellas originadas dentro del epidídimo. Entre ellas se encuentran: cabeza ancha, cabezas normales libres, membranas del acrosoma separadas y dobladas, implantación abaxial de la cola, gota citoplasmática distal, colas con curvas suaves, colas enrolladas en la porción terminal (Chenoweth, 1997; Spitzer, 2000; fuente Internet).

La presencia, en la muestra de semen, de células epiteliales, eritrocitos, formación de medusas, células precursoras de los espermatozoides, también se consideran anomalías secundarias (Spitzer, 2000; fuente Internet).

Algunos defectos espermáticos no se pueden definir exactamente como primarios o secundarios (Spitzer, 2000; fuente Internet). Por ejemplo, la gota citoplasmática proximal y las cabezas sueltas pueden ser defectos originados durante la espermatogénesis (primarios), o un disturbio en la función epididimaria (secundarios) (Chenoweth, 1997).

Se considera que al menos el 70 % de los espermatozoides evaluados deben ser normales (Chenoweth, 1997). El nivel de tolerancia máximo para los defectos de cabeza es de 15-20%, mientras que el nivel de tolerancia para los defectos de acrosoma y cola es de 25% (Blom 1977, citado por Chenoweth, 1997).

Por otro lado, es importante señalar, que una posible diferencia en la morfología de los espermatozoides de la cola del epidídimo pudiera explicarse por estudios preliminares en la especie ovina, que demostraron que la sobrevivencia de embriones resultantes de espermatozoides provenientes de la porción distal del cuerpo del epidídimo, tenían menor sobrevivencia que los embriones resultantes de espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo (Fournier-Delpech *et al.*, citado por Amann y Schanbacher, 1983).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LOS TESTÍCULOS *POST-MORTEM*

El manejo de los testículos bovinos, una vez recolectados del matadero, se realizará según protocolo de los Drs. G. Flores-Foxworth y B. Foxworth de la Universidad de Texas A&M (EE.UU.).

## Conferencia (Continuación)

# Fisiología y Reproducción

Se recolectará un total de 60 testículos, en 10 visitas al Matadero Industrial de Turmero, Edo. Aragua (6 testículos por vez; 2 visitas/semana; total de 5 semanas), y en cada caso se cumplirán los siguientes pasos:

1.1 Los testículos se recolectarán intactos, con escroto, y se procurará recobrar conjuntamente con ellos sus vasos deferentes, cuyos extremos serán ligados.

1.2 Los escrotos se lavarán con solución salina estéril, evitando que dicha solución penetre la bolsa testicular. Luego se secarán profusamente con toallas de papel y se colocarán dentro de bolsas plásticas selladas ("zip-lock"). Su transporte al laboratorio demorará entre 30 a 40 minutos, y los testículos serán refrigerados en una cava, con temperatura controlada por termómetro entre 20 a 25 °C. Para tal efecto en las cavas se colocarán dos "recipientes plásticos de hielo líquido", encima de las cuales se dispondrán rollos de papel periódico como aislantes, y sobre estos se ubicarán las bolsas con los testículos. Es importante acotar que el "estrés térmico" es uno de los factores que mayormente afecta la calidad de los espermatozoides a recolectar con este procedimiento, por tanto se tomarán todas las medidas posibles para evitar que esto ocurra.

1.3 Cada bolsa con testículos se identificará con el número correlativo correspondiente a cada testículo, según el orden en que fueron recolectados, la fecha y hora exactas de la recolección.

1.4 En cada caso se tomará en consideración el tiempo transcurrido desde la recolección de los testículos en el matadero hasta el procesamiento de cada uno de ellos en el laboratorio, y en ningún caso deberá sobrepasar las seis (6) horas.

1.5 Cada testículo se pesará y medirá (largo y ancho), con y sin epidídimo.

## 2. RECOLECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS.

Los testículos bovinos recolectados en el matadero serán procesados en el Laboratorio del Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial (I.R.A.I.A.) de la F.C.V.-U.C.V.

Los espermatozoides epididimarios se recolectarán según protocolos referidos por los Drs. G. Flores-Foxworth y B. Foxworth de la Universidad de Texas A&M (EE.UU.): 1) recolección por flujo retrógrado, 2) desmenzamiento del epidídimo; y 3) un método mixto que involucra los dos protocolos anteriores.

En cada protocolo se usarán 20 epidídimos con sus conductos deferentes escogidos en forma aleatoria, para un total de 60 epidídimos (20 x 3), y en cada caso se anotará la hora de inicio de la recolección de espermatozoides del epidídimo.

### **Protocolo 1:** *Recolección por flujo retrógrado:*

1. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se disecarán mediante el uso de implementos estériles y técnicas asépticas. Se removerá la túnica serosa y los vasos sanguíneos con un bisturí con hojilla N° 10 y tijeras.

2. Se localizará el "septum" (indentación) del epidídimo correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se realizará un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del túbulo se reduzca para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.

3. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocará en un tubo cónico de 50 ml (de centrífuga), y se mantendrá la porción libre de los vasos deferentes sujeta con los dedos pulgar e índice. Se coloca una aguja "con punta roma" (calibre 20, 21, 22, o 23, según el diámetro interno del vaso deferente) dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptará una jeringa "air-tite" de 10-20 ml llena con "medio de lavado" (PBS modificado), y con esta jeringa se perfundirá lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. Las paredes de los vasos deferentes se presionarán manualmente contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado.

*Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem 6*

## Conferencia (Continuación)

# Fisiología y Reproducción

---

4. A medida que se perfunden los vasos deferentes con el medio de lavado se notará un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, aparecerá en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario, representado por un líquido espeso y cremoso. En el momento en que el fluido recolectado se haga claro se concluirá el lavado.

5. El fluido obtenido, que deberá contener los espermatozoides epididimarios, se centrifugará a baja velocidad (300 x g) durante 5 minutos para concentrar la muestra. El sobrenadante obtenido se removerá y será descartado.

6. La concentración espermática se determinará usando el hemocitómetro (cámara de *Neubauer*) y la morfología se evaluará mediante las técnicas tradicionales de evaluación morfológica (frotis teñido con eosina-nigrosina observado al microscopio de contraste de fases).

7. La motilidad y movimientos progresivos de los espermatozoides epididimarios toman entre 40 minutos a 1 hora para comenzar. Transcurrido este lapso, los parámetros de motilidad (individual) y movimientos progresivos podrán ser estimados.

### **Protocolo 2:** *Recolección de espermatozoides por desmenuzamiento de la cola del epidídimo:*

1. La cola del epidídimo asépticamente disecada (separada de la túnica serosa y vasos sanguíneos) será completamente desmenuzada (cortada finamente) asépticamente en una placa de Petri que contenga entre 10 a 20 ml. de medio PBS modificado.

2. El contenido de la placa de Petri se vertirá en una jeringa (Air-Tite) de 20 ml. (usando un embudo de vidrio) para forzar el material desmenuzado por un filtro estéril de 0.4- 0.75 micrones, y ese filtrado se recogerá en tubos de centrifuga (50 ml). Este proceso se repetirá con 10-20 ml de medio de lavado adicional.

3. El medio filtrado, que deberá contener los espermatozoides epididimarios, será centrifugado a baja velocidad (300 x g) por 5 minutos para concentrar la muestra. El sobrenadante obtenido se removerá y será descartado.

4. Se medirá la concentración espermática y morfología, igual al protocolo anterior

5. Se tomará en consideración, igual que en el protocolo anterior, que la motilidad y movimientos progresivos de los espermatozoides epididimarios comienzan entre 40 minutos a 1 hora, aproximadamente. Transcurrido este lapso, los parámetros de motilidad y movimientos progresivos podrán ser estimados.

### **Protocolo 3.- Método Mixto:** *Perfusión más desmenuzamiento.*

### **3. EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS EPIDIDIMARIOS.**

Una vez obtenida la muestra de espermatozoides se realizarán las siguientes mediciones: volumen, concentración, motilidad individual, viabilidad espermática, anomalías espermáticas, y la integridad del acrosoma.

- a) Volumen: se determinará por apreciación visual del cilindro graduado.
- b) Concentración espermática: se determinará por recuento en la cámara hemocitométrica, previa dilución de la muestra (1:100 v:v) en glutaraldehído al 2%.
- c) Movilidad individual: se determinará mediante la observación visual al microscopio óptico (400X) del porcentaje de células móviles (0-100%) en la muestra (Fiser y Fairfull, 1989, Pontbriand *et al.*, 1989).

---

*Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem* 7

## Conferencia (Continuación)

# Fisiología y Reproducción

d) Vitalidad espermática: se medirá mediante la coloración con azul de bromofenol. Una alícuota de la muestra previamente diluida (1:3) en una solución de azul de bromofenol, se observará al microscopio para contar el porcentaje de espermatozoides vivos (no coloreados) y muertos (coloreados) (ref).

e) Morfología espermática: se determinará mediante la tinción de frotis coloreados con eosina-nigrosina, y se determinará el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y los espermatozoides con atipias.

f) Integridad funcional de la membrana celular: se evaluará mediante la prueba de hinchazón hiposmótica (Montes y Núñez, 1998). Para ello, se pesan 0.7 g de citrato de sodio y 1.3 g de fructosa que se diluyen por separado en 100 ml de agua destilada. Posteriormente ambas diluciones se mezclan a partes iguales (v:v), obteniéndose de este modo una solución hiposmótica de 140 a 159 mOsm/l. En un tubo de ensayo se vierte 1 ml de la solución hiposmótica y se coloca en Baño de María a 37°C. Cuando la solución alcanza dicha temperatura, se le añaden 10 ml de la muestra que contiene los espermatozoides, se homogeneiza y se incuba por 30 minutos a 37°C. Una vez incubada, se coloca una gota en un portaobjetos (tibio), se tapa con un cubre-objetos y se observan la cantidad de colas anormales o dobladas (membrana bioquímicamente activa). El resultado se expresa en porcentaje.-

## V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos en cada protocolo se realizará mediante prueba de medias.

## VI. LITERATURA CITADA

Amann R. P., Schanbacher B.D. 1983. Physiology of male reproduction. J. Anim.Sci., Vol 57, Supl. 2: 380-403.

Amann R. 1983. Endocrines changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. J.Dairy Sci. 66 (12): 2606-2622.

Axnér E., Linde-Forsberg C., Einarsson S. 1999. morfology and motility of spermatozoa from different regions of epididymal duct in the domestic cat. Theriogenology 52: 767-778.

Chenoweth P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: Youngquist: Current therapy in large animal theriogenology. Saunders, 1ª Edición, pag. 217.

Chung J. 1997. Effects of sperm treatments on fertilization and in vitro development of bovine follicular oocytes. Korean J. Emb.Trans. Vol 12 (2) 189-194.

De Stefano H., González B., Soto H., Godoy S. 1999. Efectos de *Trypanosoma vivax* sobre la concentración de testosterona producida como respuesta a la inyección de GnRH en un grupo de toros Siboney. Acta Científica Venezolana 50: Supl. 2: 330.

Ekstedt L., Söderquis L., Plöen L. 1986. Fine structure of spermatogenesis and sertoly cels (*Epiteliocytus sustentans*) in the bull. Anat. Histol. Embryol. 15: 23-48.

Ganong W. 1990. Gónadas: desarrollo y funciones del aparato reproductor. En Fisiología Médica. 12ª Ed. Manual Moderno. México. 365-402.

Griswold M. 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. Biol. Reprod. 52: 211-216.

Hafez C. 1989. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5ta Ed. Interamericana Mc.Graw-Hill. México 694 pp.

*Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem* 8

## Conferencia (Continuación)

# Fisiología y Reproducción

---

Hewitt D., Leahy R., Sheldon I., England G. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67: 1-2, 101- 111.

Jonson M., Everitt B. 1980. *Essential reproduction*. Blackwell Scientific Publications, 1ª Edición, pag 33.

Kastelic J., Cook B., Coulter G. 1997. Scrotal – Testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull.): 271-282.

Maddocks S., Kern S., Setchell B. 1995. Investigating local regulation of the testes of ruminants. *J. Reprod. and Fertil.* 49: 309-319.

Nakatsukasa E., Inomata T., Ikeda T., Shino M., Kashiwazaki N. 2001. Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 °C. *Reproduction – Cambridge* 122 (3): 463-467.

Perez S., De La Fuente J. <http://www.redvya.com/veterinarios/veterinarios/especialidades/reproducción/artículo06.ht>

Reyes-Moreno C., Gagnon A., Sullivan R., Sirard M. 2000. Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture médium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J Androl.* 21 (6): 876-886.

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. *Biol. Reprod.* 66 (1): 159-166.

Rodel A. 1995. Semen quality on sperm production in beef bulls with chronic dietary Vit. A deficiency and subsequent re-alimentation. *Theriogenology* 43: 1269-1277.

Rodríguez J., Madrid-Bury N., Urdaneta A., Aranguren J., Quintero A. 2000. Análisis morfométrico del epidídimo en toros jóvenes mestizos 5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo con testículos pequeños. *Revista Científica, FCV-LUZ, Vol 10 (6), 458-467.*

Setchell B. 1998. Head and the Testis. *J. Reprod. and Fertil* 114: 179-194.

Sisson S. 1975. Ruminant urogenital system. En: Sisson y Grossman's: *The anatomy of the domestic animals*. Saunders, 5ª Edición, Vol.1, pag 937.

Spitzer J. [http://www.lvis.Org/advances/Repro/Chenoweth/spitzer/chapter\\_fm.asp?](http://www.lvis.Org/advances/Repro/Chenoweth/spitzer/chapter_fm.asp?)

Van Camp S. 1997. Common causes of infertility in the bull. *Vet. Clin. of N.A: Food Animal Practice.* 13 (2).

Wrobel K., Dellmann 1993. Sistema reproductor masculino. En *Histología Veterinaria de D. Dellmann*. 2da Ed. Acribia. Zaragoza. 245-257.

---

*Recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem 9*