



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo de Fin de Grado en Veterinaria

**Estudio de diferentes factores que influyen en la calidad seminal de semen
epididimario de toro. Aplicaciones prácticas**

**Study of different factors influencing the seminal quality of epididymal bull
semen. Practical applications**

Autora:

Sofía Aventín Andrés

Directoras:

Arantxa Echegaray

Olga Mitjana

Facultad de Veterinaria

2016

AGRADECIMIENTOS

A Consorcio Mercantil de Huesca S.L, Humeco; por prestarme sus instalaciones y por el buen trato recibido.

A Arantxa Echegaray, por su eterna paciencia y su don para enseñar.

A Olga Mitjana, por guiarme en el proceso de este trabajo.

A todos los ganaderos que nos han donado las muestras con total humildad.

A todos los trabajadores del Matadero de Huesca por su amabilidad.

Gracias a todos vosotros por hacer posible este proyecto

INDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT.....	1-2
2. INTRODUCCION.....	2
2.1 La Raza de Lidia.....	3
2.1.1. La tienta.....	4
2.1.2 La retienta	4
2.1.3 Tienta a campo abierto.....	4
2.1.4 El indulto.....	4-5
2.2 Manejo de la reproducción.....	5-6
2.2.1 Sistema de monta natural.....	6
2.2.2 Sistema de monta dirigida.....	6
2.2.3 Inseminación Artificial	6-7
2.3 Sistema de recolección del semen.....	7
2.3.1 Vagina artificial	7
2.3.2 Electroeyaculador	7-8
2.3.3 Postmortem.....	8
2.4 Evaluación de los parámetros seminales.....	9
2.4.1 Aspecto y volumen.....	9
2.4.2 Concentración espermática.....	9
2.4.3 Movilidad espermática.....	9
2.4.4 Anomalías morfológicas.....	10
2.4.5 Integridad acrosómica.....	10-11
2.4.6 Estado de descondensación de la cromatina.....	11-12
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL Y METODOS.....	13
4.1 Materiales biológicos y materiales de laboratorio.....	13
4.2 Método.....	13
4.2.1 Recogida de testículos.....	13
4.2.2 Extracción semen de epidídimo	
12-15 horas post-sacrificio.....	13-14
4.2.3 Análisis CASA.....	14
4.2.4 Clasificación toros en función	

de la Motilidad inicial.....	15
4.2.5 Morfoanomalías.....	15-16
4.2.6 Valoración de Dispersión de la Cromatina Espermática	16
4.2.7 Extracción semen de epidídimo post-sacrificio.....	16-17
4.2.8 Tratamiento estadístico.....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	17
5.1 Caracterización de la calidad seminal a 12-15h post sacrificio valor inicial.....	17
5.1.1 Volumen seminal.....	17-18
5.1.2 Concentración seminal.....	18
5.1.3 Motilidad y cinética. Aptitud para la conservación.....	19
5.1.4 Morfoanomalías.....	20
5.1.5 Integridad del acrosoma.....	21
5.1.6 Integridad de la cromatina.....	21
5.1.7 Correlación entre parámetros de calidad seminal.....	23-24
5.2 Pruebas de conservación.....	23-26
6. CONCLUSIONES.....	26
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	27-32
8. ANEXO I	

1. RESUMEN / ABSTRACT

La mejora en los protocolos de criopreservación espermática post-mortem es muy importante en algunas razas como el toro de lidia, donde la bravura es uno de los criterios de selección. Nuestro objetivo es la caracterización de la calidad seminal procedente de epidídimos post-mortem, junto con su capacidad de conservación dentro del epidídimo a 5°C durante varios días de toros lidiados en la plaza. Los toros (n=31) se dividieron en 3 grupos: (A) prueba de conservación de hasta 2 días (n=20) (B) prueba de conservación de hasta 3 días (n=26) (C) prueba de conservación de hasta 4 días (n=25). Además, se añadió un cuarto grupo de animales de matadero (n=7) en los que el procesado comenzó a tan sólo 2 horas post-mortem y se conservó durante 2 días. Para definir la calidad inicial del toro, se utilizó el testículo procesado 12-15h post-sacrificio. Los parámetros seminales evaluados fueron: volumen, concentración, motilidad total, motilidad progresiva, VCL (Velocidad curvilínea), VSL (Velocidad rectilínea), VAP (Velocidad promedio), LIN (Linealidad) y STR (Rectitud del movimiento) obtenidos con el sistema CASA (*Computerized Assisted Sperm Analysis*). Además se contabilizaron los distintos tipos de morfoanomalias (tinción eosina/nigrosina) y se evaluó el estado de condensación de la cromatina (Diff-Quick modificado). En el estudio estadístico, se utilizó el Test de *Pearson* para las correlaciones, mientras que las diferencias estadísticas entre los dos testículos del mismo animal conservados a diferentes días, se determinaron mediante la comparación de medias (*Statistical Package Scientific System, SPSS for Windows, 15.0*). Los resultados muestran que, tras la muerte en la corrida, un porcentaje importante de animales 44,44%, no cumple unos mínimos de calidad seminal para garantizar una buena conservación del germoplasma. En nuestras condiciones experimentales, la conservación de los testículos a 5°C hasta 12-15 horas después de la muerte en la plaza, mantuvo la calidad seminal de las muestras. Sin embargo, no nos fue posible garantizar la viabilidad de las muestras más allá de las 15 horas de conservación.

ABSTRACT

The improvement in post-mortem sperm cryopreservation protocols is very important in some breeds such as bull fighting, where bravery is one of the selection criteria. Our objective is to evaluate seminal quality in post-mortem epididymis, combined with its preservation capacity

inside this organ at 5°C for several days, of bulls that have fought in the square. The bulls (n = 31) were divided into three groups: (A) conservation test of up to 2 days (n = 20), (B) conservation test of up to 3 days (n = 26), (C) conservation test of up to 4 days (n = 25). In addition, a fourth group of animals from the slaughterhouse (n = 7) were added, evaluating it within 2 hours post-mortem and at the second day after its death. The processed testis 12-15h post-slaughter was used to define the initial quality of the bull. The seminal parameters evaluated were: volume, concentration, total motility, progressive motility, VSL (linear velocity), VAP (linear velocity), LIN (Linearity) and STR (motion straightness) obtained with CASA (*Computerized Assisted Sperm Analysis*). In addition, the different types of morphoanomalies (eosin / nigrosine staining) were counted and the condensed state of the chromatin (modified Diff-Quick) was evaluated. In the statistical study, the *Pearson Test* for correlations was used, whereas the statistical differences amongst the two testicles of the same individual preserved at different days were determined by means comparison (*Statistical Package Scientific System, SPSS for Windows, 15.0*). The results show that, after the bullfight, a significant percentage of dead animals (44.44%) do not meet a minimum of seminal quality to ensure a good conservation of the germplasm. In our experimental conditions, preservation of the testes at 5 °C within 12-15 hours after the death in the run, guaranteed the seminal quality of the samples. However, under our experimental conditions, it is not possible to guarantee the viability of the samples beyond 15 hours of storage.

2. INTRODUCCION

La crianza del toro de Lidia es uno de los negocios más antiguos e importantes en nuestro país, por la gran afición a la tauromaquia que hay en él. El principal objetivo de la crianza de esta raza es la producción del comportamiento, caracterizado por su bravura (Rodríguez, 1991). Los parámetros buscados en la selección de los reproductores se basan en parámetros etológicos como la rectitud y prontitud de la embestida, y morfológicos como las henchuras, el trapío o la cornamenta. (Posado, 2014)

Uno de los problemas que se le plantea a los ganaderos de esta raza es la evaluación del carácter comportamental de los individuos. Ya que aunque en las propias ganaderías prueben a los animales a través de la tienta, no es hasta el momento de la lidia cuando se observa el

comportamiento del animal en su totalidad, y una vez aquí de poco sirve, ya que tras la lidia será sacrificado.

La preservación del material genético de ciertos individuos está adquiriendo gran importancia en este campo, por lo que se han buscado medios que permitan mantener la diversidad biológica (Rodríguez, 1991). Recuperar y criopreservar espermatozoides tomados de epidídimo constituye una manera útil de rescatar el material genético de individuos que hayan sido sacrificados en la lidia y sean valiosos para el ganadero, ya que los espermatozoides del epidídimo tienen capacidad fecundante (Saavedra y cols, 2012).

Teniendo en cuenta la importancia de la recuperación de espermatozoides que se perderían por el sacrificio del animal, el objetivo del trabajo es estudiar las características morfológicas y funcionales de espermatozoides de toros lidiados, recuperados de epidídimos refrigerados a 5°C



Figura 1. Semental de la Ganadería Juan Manuel Criado

2.1 LA RAZA DE LIDIA

El toro de lidia tuvo su origen en España, y desde aquí se extendió a Portugal, sur de Francia y numerosos países del Continente Americano durante el siglo XX. Desde sus orígenes, el toro de lidia se ha diferenciado de los restantes vacunos por la presencia de un carácter etológico propio de esta raza y que se conoce con el nombre de bravura (Rodríguez, 1991).

A lo largo de la historia, la selección realizada sobre los ejemplares destinados a los espectáculos taurinos se ha dirigido fundamentalmente a la búsqueda del carácter de bravura, circunstancia que ha dado lugar a una raza que mantiene cierta homogeneidad en su comportamiento y que se contrapone a su gran variabilidad de caracteres étnicos lo que hace que carezca de un estándar racial. Estas circunstancias convierten al toro de lidia en un ejemplar único (Purroy, 2003).

La selección del vacuno de lidia entraña grandes dificultades que vienen determinadas, de una parte, por tratarse de un carácter comportamental, difícil de interpretar, y de otra, porque su

comprobación sólo puede realizarse una vez. Además la valoración de ese comportamiento es totalmente subjetiva y personal (Rodríguez, 1991).

Para decidir si un ejemplar se queda en la ganadería como reproductor o es desechado se tienen en cuenta tres factores: Genealógico, Morfológico y Funcional, realizándose posteriormente una Comprobación de la Descendencia.

Las pruebas de valoración funcional que se realizan en la ganadería son:

2.1.1 La tienta

La tienta es una operación de campo para probar la bravura y las condiciones para la lidia de las reses. Se realiza con toda la camada de hembras de la ganadería cuando estas cumplen los dos años de edad, generalmente. En cambio en machos sólo se realiza con unos pocos ejemplares elegidos por el ganadero tras realizar la selección genealógica y morfológica previas (Posado, 2014). La tienta es llevada a cabo por toreros o por aficionados prácticos expertos en el tema, cuyo objetivo consiste en generar en el animal los estímulos que encontrará en la plaza y observar cómo reacciona, seleccionándolos por su comportamiento en la lidia y elegir así los reproductores para la ganadería (Rodríguez, 1991).

2.1.2 La retienta

Como su propio nombre indica, es una prueba consistente en volver a tentar una res. Tiene unos resultados muy dispares y poco claros, dependiendo de cada individuo y del tiempo transcurrido desde la primera tienta. Solamente es recomendable su práctica cuando un ganadero adquiere un lote de reses ya tentadas y cuyas notas desconoce o no le resultan fiables (Rodríguez, 1991).

2.1.3 Tienta a campo abierto

Sólo se realiza en algunas ganaderías andaluzas, se lleva a cabo con toda la camada de erales (animal que no supera los dos años de edad), consiste en acosar y derribar al animal, mediante un hombre a caballo utilizando como herramienta una garrocha (palo de madera de 3-4 m de longitud con una punta de acero de 16cm con la que se golpea al animal). Lo que el ganadero busca es tener idea de la bravura de cada res y de la homogeneidad o heterogeneidad que presenta la camada en este sentido (Purroy, 2003).

2.1.4 El indulto

Si el animal muestra unas condiciones excepcionales para la lidia durante el festejo se anula su sacrificio y vuelve a la ganadería. Es la prueba funcional por excelencia ya que se evalúa el

comportamiento del animal en la misma plaza de toros (Montes, 1836). Está definido en el artículo 83 del Real Decreto 145/1996 de 2 de febrero, actual Reglamento de Espectáculos Taurinos, como el perdón de la vida a aquellos animales de excelente comportamiento y trapío (buena planta de un toro de lidia) que bajo diferentes garantías reglamentarias resulten sobresalientes para la afición, el toreo, el ganadero o mayoral y la Presidencia (Posado, 2014).

El último paso para la selección de un individuo es la comprobación de su descendencia y la transmisión de buenas cualidades a la siguiente generación. Se ha hablado anteriormente de las cualidades que se exige a cada ejemplar para ser considerado reproductor en la ganadería, pese a su importancia, lo fundamental de cada reproductor no es su bravura en sí, sino el hecho de que sea capaz de transmitir todas sus virtudes a la siguiente generación (Purroy, 2003).

En el caso de las hembras es conveniente esperar a ver los resultados en la tiente de tres de sus hijas, nacidas del cruce con distintos sementales. Respecto a los machos hay que tener más cautela ya que producen un elevado número de descendientes cada año y cuando transmiten características negativas pueden hacer naufragar con rapidez todo el trabajo de selección (Montes, 1836).

2.2 MANEJO DE LA REPRODUCCIÓN

Al ser un sistema extensivo el ciclo reproductivo de esta raza se encuentra perfectamente adaptado (Purroy, 2008). Según la región donde nos encontremos se aplicara un ciclo u otro.

El MAGRAMA, a través del Libro Genealógico de la raza bovina de Lidia, controla todos los aspectos relativos a la reproducción de la raza de Lidia tanto en lo referente a la declaración de lotes de



Figura 2. Hembra de la ganadería Juan Manuel Criado

cubrición por el sistema de monta natural o monta dirigida, como el uso de técnicas de reproducción asistida. El libro está regulado por Real Decreto 2129/2008 de 26 de diciembre por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas, y la gestión del control del Libro Genealógico lo ejercen las Organizaciones y Asociaciones ganaderas, que tienen concedido el título de Entidades Colaboradoras, y se

encargan de enviar la información correspondiente al Ministerio (Posado, 2014).

2.2.1 Sistema de monta natural

Es el sistema más utilizado en la raza de Lidia, consiste en agrupar cierto número de hembras con un semental durante tres y ocho meses para obtener un número de partos considerable y ayudar al fácil manejo de la ganadería. Si la ganadería no dispone de instalaciones necesarias para separar lotes de hembras se introduce por turnos el semental para poder garantizar la paternidad (Rodríguez, 2002). Entre las ventajas de la monta natural, destaca su simplicidad en el manejo y entre los inconvenientes, la diseminación de enfermedades.

2.2.2 Sistema de monta dirigida

Este sistema no está tan extendido en esta raza, pero con él se puede duplicar, con un solo semental, el número de hembras atendidas. Se suele utilizar un macho castrado, vasectomizado o entero, con el pecho tintado de modo que marque la grupa de las hembras que intente montar, de esta manera sabemos cuáles toleran la monta y cuáles no. Las hembras aptas son encerradas de manera individual en corrales donde luego se lleva al semental elegido, permitiéndole realizar 1-2 saltos por monta (Saavedra, 2012).

Entre las ventajas destaca que, un semental puede cubrir un número elevado de vacas, elegir los cruzamientos, concentrar las cubriciones y los partos, utilizar tratamientos de sincronización de celo en las hembras y mejorar el manejo reproductivo en los sementales viejos y entre los inconvenientes, el elevado coste de la mano de obra, la complejidad para detectar hembras en el campo y la posible inhibición sexual del macho por realizarse en condiciones no habituales (Posado, 2014).

2.2.3 Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) es la técnica más importante creada para el mejoramiento genético de los animales. Esto es posible porque con unos pocos machos altamente seleccionados se producen suficientes espermatozoides para inseminar miles de hembras al año. (Hafez, 1989). Básicamente la IA consiste en la introducción de semen en vacas de toros genéticamente calificados a los cuales se les ha recolectado el semen por distintos métodos. Este semen permanece conservado hasta su utilización (Foote, 2002).

Algunas de las ventajas de esta técnica son su gran rapidez, el bajo riesgo de lesión del toro, el

bajo coste económico y sobre todo el aprovechamiento de la muestra seminal. Y como inconvenientes principales sería la necesidad de un buen conocimiento de la técnica por parte del operario, el estrés generado en el animal y la disminución de la fertilidad en la criopreservación del semen (Vishwanath, 2003).

2.3 SISTEMAS DE RECOLECCIÓN DEL SEMEN

Existen tres métodos de colección de semen: la vagina artificial, la electroeyaculación y la recogida postmórtem.

2.3.1 Vagina artificial.

Es un método muy práctico y da muy buenos resultados. Consiste en un tubo rígido con una manga de goma que se llena con agua tibia (40º) a fin de simular la temperatura corporal. El toro debe ser estimulado con una vaca o novilla que se encuentre en celo para estimular la excitación y sucesiva eyaculación. En el momento que de la protusión del pene, se desvía con la mano y se introduce en la vagina artificial, donde se deposita el semen. (Hafez, 1989)

Como ventajas se podría destacar el bajo coste del colector del semen y la disminución de estrés causado en el animal comparándolo con otras técnicas como la electroeyaculación (Barth, 2004).



Figura 3. Extracción de muestra seminal con vagina artificial

2.3.2 Electroeyaculación

La electroeyaculación es la técnica de recogida seminal más utilizada en la raza de Lidia por su sencillez, rapidez y eficacia. En este método se hace uso de un electroeyaculador que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas

por corrientes no mayores a 20 voltios (Hafez, 1989).

El electroeyaculador es introducido en el recto del toro y su función es estimular las glándulas anexas del aparato reproductor del toro para facilitar el eyaculado. La estimulación no extenderá a más de cinco minutos.

El toro estimulado logrará la protrusión del pene entre 5 y 8 minutos después de iniciada la estimulación, en algunos casos se debe ayudar al toro. Se debe tener preparado con anticipación el material a utilizar para la recolección del semen (Cary, 2004)

2.3.3 Postmórtem

Tras la muerte del animal existen técnicas como la recolección de espermatozoides de la cola de los epidídimos muy útiles para conservar el material genético de animales en extinción o en el caso de la raza de Lidia de individuos de alto valor para el ganadero y que son sacrificados durante su lidia en la plaza. La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides sucede en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y es en la cola de este último donde se almacenan. La técnica consiste en, extraer los testículos del escroto y separar las colas epididimarias cortando la unión entre la base del testículo con el cuerpo del epidídimo y con el conducto deferente (Albers, 2006; Ribeiro, 2014; Oyeyemi, 2006).

Posteriormente la extracción de los espermatozoides se puede realizar por tres métodos:

- **Recolección por flujo retrógrado:** mediante corte transversal en el septum del epidídimo y perfusión.
- **Recolección por desmenuzamiento de la cola del epidídimo:** se corta finamente y se filtra la cola del epidídimo, para obtener el material seminal.
- **Método mixto:** perfusión más desmenuzamiento. (Posado, 2014)

Para la supervivencia espermática es muy importante el manejo del epidídimo y el tiempo transcurrido desde el sacrificio del animal hasta la extracción del semen, así como la refrigeración del testículo una vez extraído (Papa, 2015)

2.4 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS SEMINALES

El espermatozoide es una célula altamente especializada y con una función biológica compleja, se puede ver modificada por diversos factores ya sean externos o internos, para determinar el potencial de fertilidad es necesario el análisis de distintas características físicas que se describen a continuación (Hafez, 1989):

2.4.1 Aspecto y volumen

El eyaculado de toro se caracteriza por un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento, que contiene una suspensión de espermatozoides en plasma seminal. El análisis del aspecto y el volumen se debe realizar tras la eyaculación. La muestra será descartada con la presencia de pelos, contaminantes externos y suciedad. A partir del grado de opacidad de la muestra podemos deducir la concentración aproximada de espermatozoides (Posado, 2014).

El volumen medio establecido para el ganado bovino es de 4-6 cm³ con una variación de entre 1-15 cm³. Concretamente los toros jóvenes pueden suministrar de 1 a 3 cm³ de semen, mientras que los adultos (11-13 años) pueden eyacular de 10 a 15 cm³ (Hafez, 1989). En función del método de recogida, estado fisiológico del macho, raza, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete se pueden observar variaciones en la muestra.

2.4.2 Concentración espermática.

La concentración espermática se define como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por ml) del eyaculado. La concentración media para el ganado bovino es de 2×10^8 espermatozoides/ml en jóvenes y de $1,8 \times 10^9$ espermatozoides/ml en los adultos, pero existe una alta variabilidad entre toros, e incluso entre distintos eyaculados de un mismo toro (Lu, 2004; Hafez, 1989).

2.4.3. Movilidad espermática

La movilidad espermática refleja la actividad flagelar del espermatozoide siendo este un parámetro fundamental para el transporte espermático y la capacidad de penetración en el

ovocito, aunque no nos asegura la capacidad fecundante del mismo (Bilodeau, 2001; Moreno, 2002).

Existen varias formas de evaluación de la movilidad espermática:

- **Movilidad masal:** movimiento de superficie que refleja el vigor de las ondas que produce la masa espermática en movimiento.
- **Movilidad individual:** se observa el porcentaje de células móviles de una muestra y la calidad del movimiento.
- **Movilidad progresiva:** es el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo.

El estudio de la movilidad espermática se puede realizar por dos métodos el más utilizado es la valoración subjetiva que consiste en evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles, así como, el tipo de movimiento que presentan de forma inmediata y económica. Es de gran valor cuando lo realizan personas experimentadas sin embargo, la exactitud y precisión están limitadas en función de las condiciones del sistema de medida y de la destreza del observador (Hafez, 1989).

El otro método, se basa en el uso de sistemas informatizados de digitalización de imágenes denominados CASA (Computer Assisted Motility Analysis). Capturan el movimiento espermático y lo analizan en tiempo real, aportando un gran volumen de información (Hoflack y cols., 2006, Contril y cols., 2009).

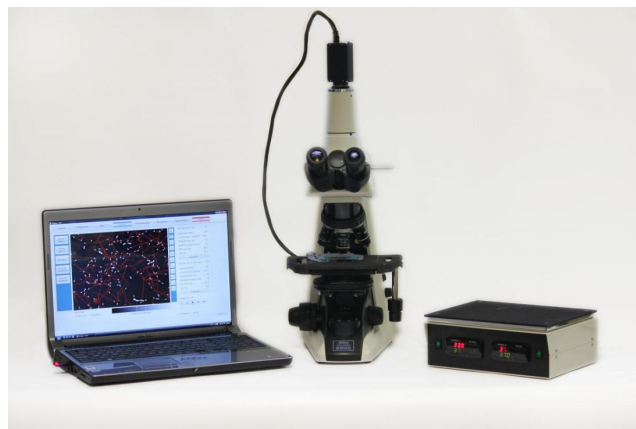


Figura 4. Capturas del sistema CASA en el momento de obtención de los parámetros cinéticos

Para conocer qué método es más objetivo, Januskauskas y col., (2001) realizaron un análisis de

la movilidad post-descongelación con la valoración subjetiva y el análisis informatizado y los resultados no difirieron significativamente. En ambos casos hubo correlaciones positivas entre movilidad y fertilidad (Contri, 2010).

2.4.4. Anomalías morfológicas.

El análisis morfológico de los espermatozoides es una prueba de control de calidad que refleja el estado fisiológico o patológico de la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias del semental (Chenoweth, 2005, Enciso y cols., 2011). Se producen por una espermatogénesis o espermiogénesis defectuosas, por herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones medio ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de 60 días) o por el uso de técnicas inadecuadas en la manipulación del semen. Generalmente se acepta que no deben existir más de un 30% de anomalías morfológicas en los recuentos efectuados. Se pueden utilizar técnicas de valoración subjetiva con diversas tinciones (Eosina-Nigrosina, Papanicolau, Giemsa, Diff-Quik), por fijación con glutaraldehído o formaldehído de la muestra y a continuación se realiza la valoración por microscopía de contraste de fases (Saacke, 2008; Walters, 2004).

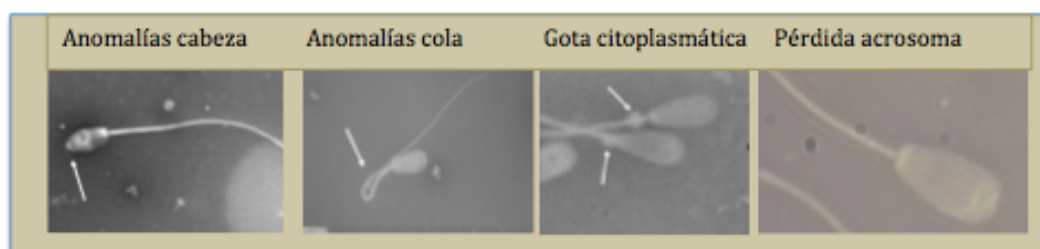


Figura 5. Capturas de espermatozoides con anomalías obtenidas durante el estudio.

2.4.5 Integridad acrosómica

Cabe destacar entre las morfoanomalías aquellas que afectan al acrosoma. El acrosoma es un saco membranoso con propiedades de lisosoma que recubre la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide. Para que un espermatozoide pueda, durante el proceso de fecundación, penetrar al ovocito cruzando la zona pelúcida, es necesario que sufra la denominada reacción acrosómica, es decir liberar el contenido acrosomal cuando está en presencia del ovocito. Para ello debe alcanzar el lugar de fecundación teniendo el acrosoma intacto. Durante la recogida,

procesado y la conservación de los eyaculados, los espermatozoides pueden experimentar la denominada “falsa” reacción acrosómica, es decir liberar el contenido acrosomal, lo cual les incapacitará para la fecundación. Para comprobar su integridad, debemos analizar el borde apical del espermatozoide en forma de semiluna o uña y constatar cuantos espermatozoides mantienen dicha semiluna intacta (Hafez, 1989) (Anexo I).

2.4.6 Estado de descondensación de la cromatina.

Durante la espermatogénesis los espermatozoides sufren un proceso de maduración en el epidídimo y se produce el cambio de espermatogonias diploides a espermatozoides maduros haploides. Este proceso de maduración conlleva el empaquetamiento de la cromatina nuclear y las protaminas, sustituirán a las histonas (Evenson, 1980). La espermatogénesis defectuosa, la apoptosis celular o el estrés oxidativo, alteran el estado de condensación de la cromatina espermática. Las alteraciones de la cromatina con la infertilidad en la especie bovina (Ballachey y col., 1987; Karabinus y col., 1990),

Metodologías para la detección del daño en el ADN espermático son el test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersión) (Fernández y col., 2003; Gosálvez y col., 2006; Fernández y col., 2007) el ensayo cometa (Slowinska y col., 2008; Enciso, y col., 2011b; Gosálvez y col., 2011b; Gliozzi y col., 20119, el Ensayo de estructura de la cromatina (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay) (Ballachey y col., 1987) el Ensayo de marcado del extremo libre por dUTP (TUNEL: Terminal dUTP Nick End Labeling) (Gorczyca y col., 1993). También existen metodologías de tinción basadas en el empleo del Azul de Anilina, el Azul de toluidina o el Diff Quick, en las que el colorante metacromático se incorpora en la cromatina en los espermatozoides dañado o a los espermatozoides donde la cromatina todavía posee histonas ,defecto de protaminación (Oliveira et al, 2013).

3. OBJETIVOS

En este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la calidad seminal de espermatozoides epididimarios de toros de lidia tras su muerte en la plaza.
2. Evaluar el efecto de diferentes tiempos de conservación sobre los parámetros de calidad seminal.
3. Comprobar si la técnica de extracción seminal de epidídimo es útil para la criopreservación espermática en estas condiciones.
4. Extraer recomendaciones sobre el protocolo más adecuado para obtener muestras viables a partir de esta técnica.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y LABORATORIAL

En este estudio se han utilizado los testículos obtenidos post-mortem de 31 toros lidiados en las fiestas de San Lorenzo del año 2015 en la comarca de Huesca de 8 ganaderías distintas y 7 toros de matadero. El rango de edad de los toros de lidia fue entre 4-5 años, sin embargo los toros del matadero fueron menores de 2 años. Respecto al material se ha utilizado el material inventariable y fungible de uso habitual en un laboratorio de tecnología seminal.

4.2. MÉTODO

4.2.1. Recogida testículos

En matadero o en plaza de toros, tras la muerte del animal fueron extraídos de la canal y transportados en nevera portátil a 5°C hasta el laboratorio donde se conservaron en refrigeración.

4.2.2. Extracción semen epididimario 12-15h post-sacrificio

- Utilizaremos uno de los testículos y el otro lo reservaremos para un posterior procesado en refrigeración.

- Disección de la cola del epidídimo y el conducto deferente, retirando la túnica vaginal y los vasos sanguíneos con bisturí y tijera recta.
- Localizar la zona media de la cola del epidídimo y realizar un corte transversal en el lugar anterior al comienzo de la disminución del diámetro epidídimo, para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.
- Situamos la cola del epidídimo en una placa de Petri, previamente tarada, para luego poder pesar el volumen de muestra extraído, se introduce una aguja de calibre 22 con punta "roma" y una jeringa de 20 ml con aproximadamente 10 ml del diluyente Triladyl® (Minitube) e introducimos el contenido de la jeringa en el interior del epidídimo de tal manera que el diluyente arrastra el contenido espermático que esté acumulado en el epidídimo. A continuación, se obtiene lentamente el líquido espermático epididimario por el extremo cortado de la cola del epidídimo.
- Para saber el volumen de muestra recogido, pesamos la placa de Petri con el contenido extraído y a este peso le restamos el de la placa, previamente tarada y el del volumen de diluyente utilizado para el lavado en este caso 10ml.

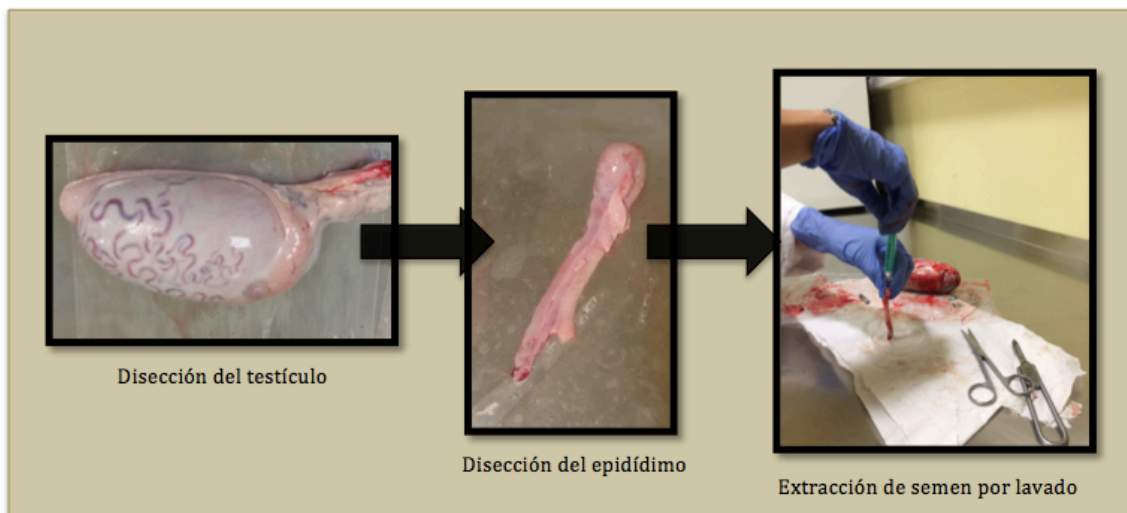


Figura 6. Diferentes fases de la extracción de semen epididimario durante el estudio laboratorial.

4.2.3 Análisis CASA

- Diluimos 250 ul de semen en 750ul de medio Europlus (PBS y 0,4% seroalbumina)
- Se toma una alícuota de 5 ul que se deposita entre cubre y porta

- Posteriormente se coloca la preparación sobre la platina del microscopio a 37°C y se procede a la captura de imágenes
- La generación de imágenes se realiza a través de una cámara de vídeo digital con un ocular fotográfico interpuesto de 3,3 X conectado al microscopio de contraste de fases y objetivo de 100X. Y este microscopio a su vez conectado a un ordenador, que es donde veremos dichas imágenes.
- En este ordenador está instalado el programa SCOPUS, es un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que analiza muestras espermáticas, proporcionando sus características de concentración, velocidad y cinética: la concentración (mill/ml), motilidad total(%), motilidad progresiva, velocidad de la trayectoria media VAP(um/seg), velocidad curvilínea VCL(um/seg), velocidad rectilínea VSL(um/seg), rectitud STR(%) y linealidad LIN (%) de cada muestra.

4.2.4. Clasificación de los toros en función de su motilidad inicial

Siguiendo el criterio establecido por Posado Ferreras (2014), clasificamos los toros en diferentes grupos en función de su motilidad seminal de partida. Se considera apto a partir de una movilidad individual ≥ 60 % y se consideró bueno a partir de un 70 % de espermatozoides móviles.

4.2.5 Morfoanomalias

La valoración del porcentaje de morfoanomalías se realizara siguiendo la técnica siguiente:

- Atemperar un porta-objetos y un cubre-objetos por muestra a 37°C en la placa calefactora.
- Depositar 20 ul de dosis en el portaobjeto ya atemperado y añadirle 10 ul de eosina-nigrosina. Mezclar ambas soluciones.
- Extender una fina capa de la mezcla de ambas soluciones sobre todo el portaobjetos.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Observar al microscopio con el objetivo de (40x o 100x)

- Evaluar las morfoanomalías contando 200 espermatozoides en la extensión para cada valoración y con el criterio de normales o alterados.
- Estimar el resultado en porcentaje de espermatozoides que presentan estas morfoanomalías; clasificándolas de la siguiente manera: Anomalías cabeza; Anomalías pieza intermedia, Anomalías cola, Gota proximal, Gota distal y Acrosomas dañados.

4.2.6 Valoración de Dispersión de la Cromatina Espermática mediante tinción Diff Quick

- Incubaremos la muestra durante 4h a 37°C, ya que se ha demostrado que así se acelera el proceso de descondensación de la cromatina en individuos con patología.
- Colocamos una alícuota de 5ul de la muestra en un porta
- Realizamos la extensión con otro porta
- Lo fijamos con mechero o placa calefactora durante unos minutos
- Introducimos el porta con la muestra fijada en el primer pocillo que contiene una solución alcohólica durante una hora
- Sin aclarar introducimos directamente en el segundo pocillo con tinción 1 durante otra hora
- Y por último introducimos de nuevo durante otra hora la muestra en el tercer pocillo con tinción 2
- El último paso sería el aclarado con agua de grifo.
- Observamos la muestra al microscopio y diferenciaremos los espermatozoides con la cromatina dispersa por su color rojo intenso y los que no la tienen condensada por su color azul.

4.2.7 Extracción semen epididimario a varios días post-sacrificio

Realizaremos los mismos pasos vistos hasta ahora pero con el otro testículo que habremos guardado en refrigeración a 5°C hasta entonces. Los toros (n=31) se dividieron en 3 grupos: (A) prueba de conservación de hasta 2 días (n=20) (B) prueba de conservación de hasta 3 días (n=26) y (C) prueba de conservación de hasta 4 días (n=25). Además, se añadió un cuarto grupo de animales de matadero (n=7) en los que el procesado comenzó a tan sólo 2 horas post-mortem y se conservó durante 2 días.

4.2.8 Tratamiento estadístico

Se realizó un análisis estadístico donde los resultados son presentados como media (X) \pm desviación estándar (DE). Para las correlaciones se utilizó el test de Pearson. Las diferencias estadísticas entre los dos testículos del mismo animal conservados a diferentes días, se determinaron mediante la comparación de medias. También se evaluó el efecto de la ganadería por un análisis de varianza (One-way ANOVA) o por su similar no paramétrico Kruskal-Wallis- (Statistical Package Scientific System, SPSS para Windows, 15.0). Cuando se obtuvo diferencias, se aplicó el test de comparaciones múltiples de Duncan. La homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene; en los casos en que no se cumplieron estas condiciones se transformó la variable. Se trabajó para un nivel de significación de $p < 0,05$.

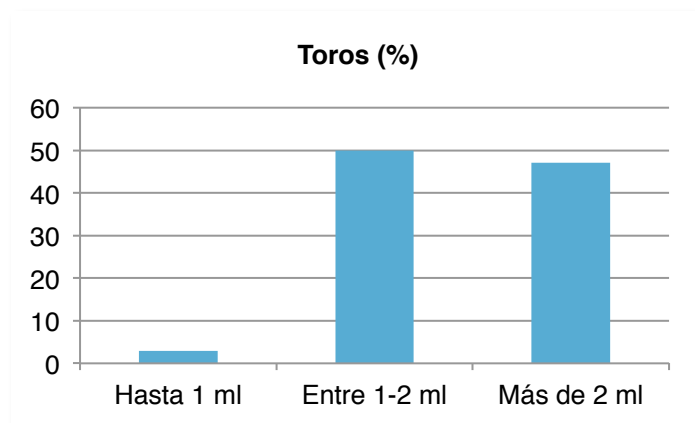
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la calidad seminal a 12-15 horas post-mortem (valor inicial)

Este trabajo es, hasta donde hemos encontrado en la bibliografía, el que examina mayor volumen de animales de lidia, sacrificados en la plaza, ya que se han obtenido muestras de 31 toros de lidia y 7 de matadero, haciendo un total de 72 epidídimos analizados. Los estudios encontrados hasta el momento han analizado como máximo 28 toros en el caso de Victoria Sánchez Israel, 22 toros en el de A.Ribeiro-Peres (2014) o 12 animales en el estudio de Saavedra G.D et al. (2012).

5.1.1. Volumen seminal

Se afirma la técnica de extracción seminal de epididimo como una buena forma de criopreservar el germoplasma masculino. En el presente estudio se ha demostrado que la técnica de extracción de semen de epidídimo es una buena elección para la criopreservación de germoplasma masculino en casos de sacrificio inevitable del semental, aunque la técnica entraña dificultades. La primera de ellas, obtener una muestra suficiente de esperma del epidídimo. En nuestro estudio el volumen seminal extraído tras canulación y posterior desmenuzamiento del epidídimo fue de tan solo $0,96 \pm 0,38$ ml por epidídimo y de $1,93 \pm 0,44$ ml por toro. Este volumen es algo inferior al volumen medio obtenido por Posado Ferreras (2014), con 4 ml por toro o a los 3,9 ml que Amann y Almquist, (1961) obtuvieron del epidídimo, en 8 toros Hosltein.



Volumen seminal obtenido	N	Porcentaje de toros (%)
Hasta 1 ml	1	2,9
Entre 1-2 ml	17	50,00
Más de 2 ml	16	47,05

Tabla y gráfica 1. Distribución del volumen de semen epididimario obtenido en el grupo de toros procesados (n=34).

5.1.2 Concentración seminal

La concentración media de los eyaculados fue de $468,32 \pm 311,13$ millones de spz/ml. Este dato es inferior al presentado por Posado Ferreras (2014), con $1385,88 \pm 732,691$ millones de spz/ml.

Concentración seminal (millones spz/ ml)	N	Porcentaje de epidídimos (%)
Hasta 100	4	5,88
Entre 100-500	41	60,29
Más de 500	23	33,82

Tabla 2. Distribución de concentraciones espermáticas de semen epididimario obtenido en el grupo de epidídimos procesados (n=68):

5.1.3 Motilidad y cinética. Aptitud para la conservación.

Otro inconveniente, es que la motilidad de partida no siempre es adecuada para proceder a la conservación. Como se menciona en el apartado de material y métodos, los animales fueron

clasificados en función de su motilidad de partida en no-aptos (menos del 60% de motilidad total), aptos (más del 60% de motilidad), buenos (más del 70% de motilidad total).

En nuestro el 55,5% de los 36 toros analizados tenían una motilidad total de partida apta o buena para garantizar una conservación (Tabla 1). Fue necesario descartar 17 de los 31 animales iniciales por motilidades inferiores al 60% a día uno, acontecimiento habitual en otros estudios como en el de Victoria Sánchez Israel, donde descartaron el 67, el 86% de los animales.

	Mot T	Mot P	VAP	VCL	VSL	LIN	STR
NO APTO	22,78±1	6,55±5,	19,78±1	46,95±21	11,12±	23,03±	38,4±2
(<60% MotT) n=16	2,34	76	0,40	,89	7,95	7,98	9,04
APTO	61,75±6,	16,72±	35,9±8,9	79,91±18	18,63±	23,37±	56±4,6
(>60% MotT) n=6	04	3,08	1	,37	5,4	2,42	9
BUENO	85,12±7,	22,4±8,	49,53±1	106,59±2	25,96±	23,49±	43,2±2
(>70% MotT) n=14	35	09	5,70	8,61	8,79	3,37	1,67

Tabla 3 .Comparativa de las medias y desviaciones estándar de las motilidades y parámetros cinéticos a día 1 entre tres grupos de individuos APTOS, NO APTOS y BUENOS

En el trabajo de Posado Ferreras (2014), se obtuvo una motilidad media a partir de 10 toros de lidia sacrificados en la corrida del 60,50±24,99%. Mientras que Stout, (2012) en 4 toros de la raza Holstein 70,60%, Amann y Griel (1974) en 7 toros de la raza Holstein del 65%.

Otros autores (Amann y Almquist, 1961; Way y col., 2000; Reyes-Moreno y col., 2000) utilizando la misma técnica de obtención, reportaron valores de Motilidad de 70%, 67-75% y 96%, respectivamente. En nuestro estudio, si se obviasen los 3 peores toros con motilidad prácticamente nula (inferior al 5%), el porcentaje de motilidad media se situaría en el 59,00± 29,7%, valores similares a los de Posado Ferreras.

		NO APTOS %	APTOS%	BUENOS%
Ganadería A	n=4	-	75	25
Ganadería B	n=6	66,60	-	33,33
Ganadería C	n=6	25	25	50
Ganadería D	n=4	-	-	100
Ganadería E	n=3	-	-	100
Ganadería F	n=2	66,6	16,66	16,66
Ganadería G	n=1	66,6	33,3	0
Ganadería H	n=5	60	0	40

Tabla 4. Comparativa de calidad espermática entre ganaderías

Otros autores como Saavedra y cols. (2012) realizaron la comparativa de los parámetros cinéticos y las motilidades entre dos ganaderías (12 animales pertenecientes a dos ganaderías distintas) y se observó que para las variables evaluadas; concentración espermática, la motilidad individual, vivos y muertos, morfoanomalías y acrosomas normales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre testículos sino que se encontró que en las variables que hubo diferencias estadísticamente significativas, siempre se presentaba entre ganaderías y no tuvo que ver nada el efecto testículo. Las diferencias significativas en las variables encontradas fueron siempre entre ambas ganaderías y no entre animales, por lo que hay que pensar, que en principio, existe bastante homogeneidad para los parámetros reproductivos entre los animales de una misma ganadería, ya que genéticamente es una población muy homogénea y que en ocasiones lucha para evitar la consanguinidad (Cañón, 2005).

En nuestro estudio, no se ha encontrado efecto significativo por ganadería de origen, ni el día de procesado inicial, pero esto podría deberse al pequeño número de ejemplares testados en alguna de las ganaderías.

5.1.4 Morfoanomalías

Para el análisis de morfoanomalías espermáticas en función de la ganadería sólo se puede realizar una estadística descriptiva, por el bajo número de animales de algunas ganaderías. En la ganadería D muestra en general toros con un mayor porcentaje de anomalías de cabeza y la ganadería C, un mayor porcentaje de gotas proximales. Esto se relacionó con la calidad de la

espermatogénesis y con pruebas de valuación del parénquima testicular (datos no mostrado, Echegaray y cols, 2016).

		FA. cabeza	FA. p.inter	FA. cola	FA.gotaprox	FA.gotadistal
Ganadería A	n=4	2,75±2,53	3,12±2,17	3,25±2,22	5±1,78	40,75±31,02
Ganadería B	n=6	3,25±2,44	4,75±6,01	1,5±1,41	7,08±3,15	64,25±12,57
Ganadería C	n= 6	3,25±2,73	1,58±1,16	1,83±1,21	10,17±10,91	55,67±19,78
Ganadería D	n=4	9,25±7,72	1,5±1,29	1,12±0,63	4,25±1,94	69,75±8,31
Ganadería E	n=3	0,83±1,04	2,67±1,04	2,17±1,75	2,17±1,61	58,67±31,95
Ganadería F	n=2	1,75±0,35	1±1,41	14±5,66	4±2,12	34,75±32,17
Ganadería G	n=1	0	0,5±0,5	0	4±4	51±51
Ganadería H	n=5	1,4±1,08	0,6±0,55	3,5±1,58	9±15,75	44,5±17,68

Tabla 5. Tabla comparativa del porcentaje de morfoanomalias según las distintas ganaderías.

(FA; formas anormales, p.inter: piezas intermedia; gotaprox: gotas proximales).

5.1.5 Integridad del acrosoma

La integridad del acrosoma fue un parámetro que apenas estaba alterado en las muestras de partida. El porcentaje medio de acrosomas dañados fue de tan sólo 2,00±1,46 %. No hemos encontrado en la bibliografía, nadie que muestre este parámetro en semen bovino recién recolectado de epidídimo, aunque el resultado es comparable al que muchos han encontrado en semen fresco de eyaculado bovino (Kumar y cols., 2015).

5.1.6 Integridad de la cromatina

Se realizó la prueba en un total de 25 toros. Los resultados mostraron niveles muy bajos de descondensación cromatínica, inferiores siempre al 1,5%. En muchos toros el resultado fue nulo (25%). No hubo diferencias apreciables en ningún toro o ganadería. Además, muchos de los espermatozoides con cromatina descondensada, un 23,33%, tenían además una cabeza normal. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores para semen eyaculado de toro (Oliveira y cols., 2013, Andraszek y cols., 2014).

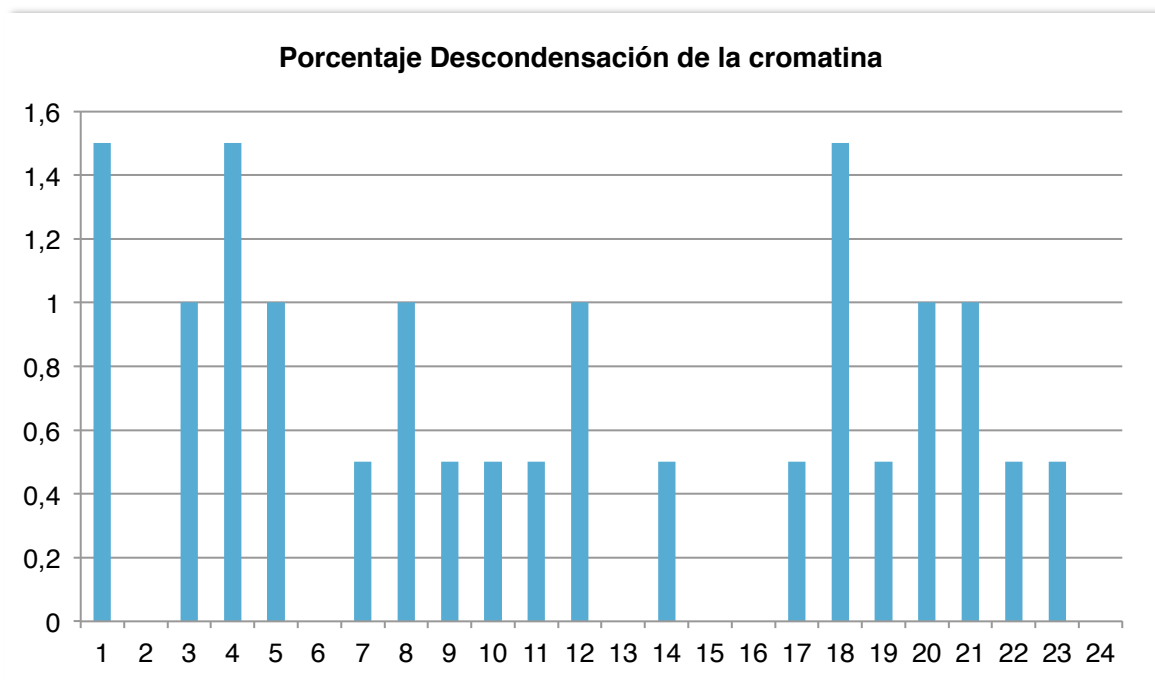


Gráfico 2. Porcentaje de espermatozoides con descondensación de la cromatina en cada de los 25 toros.

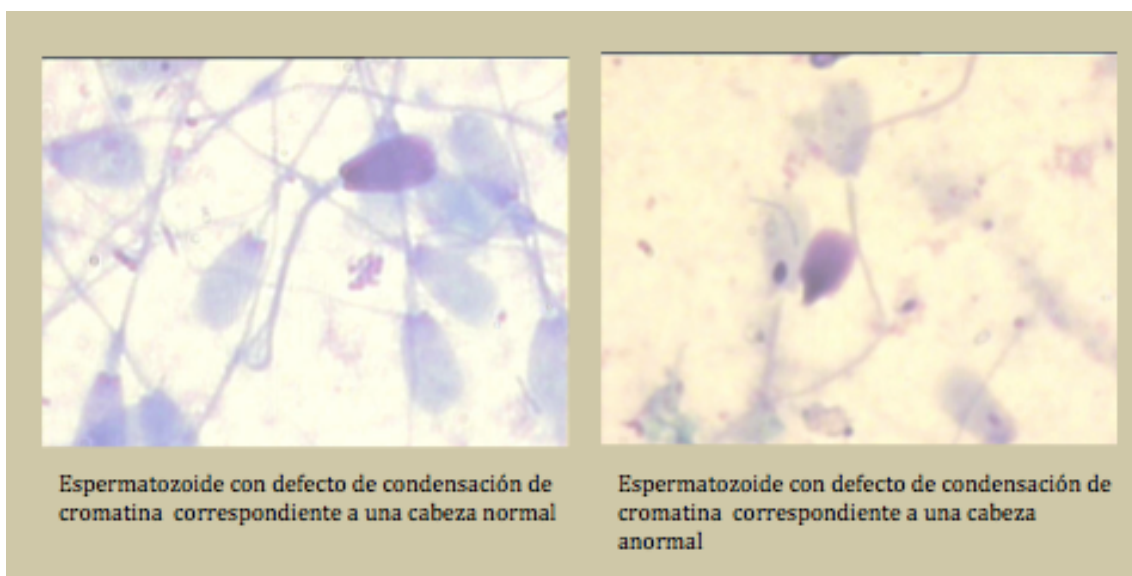


Figura 7. Espermatozoides normales junto a Espermatozoides con descondensación cromatinica.

5.1.7 Correlación entre parámetros de calidad seminal

En el estudio de las correlaciones, aparecen relaciones muy significativas entre el volumen y la concentración seminal. También aparecen relaciones previsibles entre los diferentes parámetros de motilidad y velocidad. Curiosamente, aparece una relación positiva entre el porcentaje de espermatozoides con gotas distales y la rectitud del movimiento de la población de espermatozoides. En la bibliografía, existen autores que describen una mayor rectitud de movimiento en los espermatozoides epididimarios con respecto a los del eyaculado (Van der Horst y cols., 1999, Santos, Gradela y Moraes, 2015) y una de las mayores diferencias entre ambos tipos de semen es el alto porcentaje de gotas distales del espermatozoide epididimario. Nuestros resultados sugieren una posible explicación a estas diferencias cinéticas.

	MotT	MotP	VAP	LIN	VSL	VCL	STR	Vol	Con	Acros	FACA	FAPi	FACO	FAGp
MotP	0,79**													
VAP	0,79**	0,86**												
LIN	-	-												
VSL	0,70**	0,90**	0,96**	0,42*										
VCL	0,81**	0,83**	0,99**	-	0,95**									
STR	-	0,48*	-	0,57**	0,45*	-								
Vol	-	-	-	-	-	-	-							
Con	-	-	-	-0,40*	-	-	-	-0,49**	-					
Acros	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
FACab	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
FAPi	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
FACO	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
FAGp	-	-	-	0,37*	-	-	0,40*	-	-	-	-	-	-	-
FAGd	-	-	-	-	-	-	0,71**	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6. Correlación entre los parámetros cinéticos, volumen, concentración y los porcentajes de morfoanomalias. Donde, ** la correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral) y * la correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

5.2. Pruebas de conservación

En nuestras condiciones de trabajo un alto porcentaje de muestras pierde gran parte de su motilidad en las primeras 48 horas. El procesamiento inmediato de los testículos (muestras de

matadero), no mejora mucho la situación.

La cola del epidídimo proporciona un medio óptimo para la supervivencia espermática durante un periodo de tiempo, si éste se alarga sin realizar la extracción, la refrigeración se considera necesaria para minimizar el daño a la integridad del espermatozoide en el toro (Malcotti y col., 2012).

A continuación se muestran los resultados de las distintas pruebas de conservación a diferentes días; dos días (tabla 8) donde no se encuentran diferencias significativas entre ambos testículos. Sin embargo en el grupo B, tres días (tabla 9) se observa un descenso significativo en la calidad. Los toros obtenidos en el matadero (tabla 11) también muestran dicho descenso en algunos parámetros indicativos de la calidad seminal. No se compararon los datos entre ambos, toros de lidia y de matadero debido a la gran diferencia de edad entre ambos grupos.

Grupo A: Procesado a 12-15 h/5°C, conservación hasta 2 días

Día	n	MotT	MotP	VAP	LIN	VSL	VCL	STR	Acrosomas
1	2	85,8±8,34	13,55±18,17	31,00±25,88	24,45±0,92	16,15±14,92	74,1±52,32	26,65±37,68	3,50±0,00
2	2	57,1±32,8	12,85±12,65	11,75±16,61	11,25±15,90	4,95±7,00	25,15±35,56	23,15±32,73	2,78±0,00

Tabla 7. Resultados del **Grupo A** de los distintos parámetros del análisis CASA, procesado a 12-15 h/5°C, conservación hasta 2 días.

Los datos están expresados media±SD, *p≤0,05; ** p≤0,01.

Grupo B: Procesado a 12-15 h/5°C, conservación hasta 3 días

Día	n	MotT_A	MotP_A	VAP	LIN	VSL	VCL	STR	Acrosomas
1	7	82,87±14,08	23,33±6,81	48,52±16,15	24,14±2,94	25,48±8,82	100,09±30,10	52,92±3,16	1,85±1,46
3	7	10,28±8,53*	1,54±1,70**	12,04±2,02**	26,35±5,97	5,89±1,41**	33,58±5,7**	31,90±30,4	2,78±2,48

Tabla 8. Resultados del **Grupo B** de los distintos parámetros del análisis CASA, procesado a 12-15 h/5°C, conservación hasta 3 días.

Los datos están expresados media±SD; *p≤0,05; ** p≤0,01.

En el siguiente grupo C, en el que se conservaron 4 días

Grupo C: Procesado a 12-15 h/5°C, conservación hasta 4 días

Día	n	MotT_A	MotP_A	VAP	LIN	VSL	VCL	STR	Acrosomas
1	7	75,16±11,72	18,86±5,83	50,67±13,71	21,87±3,81	25,39±8,90	111,5±24,9	39,82±27,0	1,85±2,01
4	7	7,57±4,18*	1,01±0,67*	10,19±0,93*	24,31±5,31	4,8±0,38*	30,87±4,26	18,72±28,9	1,35±1,51

Tabla 9. Resultados del **Grupo C** de los distintos parámetros del análisis CASA, procesado a 12-15 h/5°C, conservación hasta **4 días**.

Los datos están expresados media±SD; * p≤0,05; ** p≤0,01

Grupo D: Matadero: Procesado a 2h/5°C/conservación hasta 2 días

Día	n	MotT_A	MotP_A	VAP	LIN	VSL	VCL	STR	Acrosomas
1	3	77,83±2,86	23,93±2,61	40,80±4,95	23,40±1,5	23,00±3,34	89,83±8,55	52,30±4,10	0,87±0,47
2	3	32,8±33,91	3,30±2,82*	22,47±9,17*	20,17±5,27	8,87±3,30*	57,10±17,95*	27,77±24,63	3,75±2,50

Tabla 10. Resultados del **Grupo D: Matadero** de los distintos parámetros del análisis CASA, procesado a 12-15 h/5°C, conservación hasta **2 días**. Los datos están expresados media±SD; * p≤0,05; ** p≤0,01.

Se ha demostrado que el descenso progresivo de la temperatura de conservación de los testículos hasta los 5°C, inmediatamente después de la muerte del toro, disminuye el metabolismo espermático, la pérdida de energía y aumenta la viabilidad de los espermatozoides (Martins y col., 2009). Algunos autores han almacenado los testículos de toro para saber cómo afecta a los parámetros espermáticos el paso del tiempo. En concreto, Malcotti y col., (2012) comprobaron que el esperma epididimario de toro extraído tras 102 h de almacenamiento de los epididimos a 5°C retenía el 20% de su motilidad. En nuestro caso, la motilidad de las muestras a 4 días era una media del 7,57±4,18%, un dato inferior que podría explicarse por la población de partida (toros de corrida vs toros de matadero en el experimento de Mattioli) o por el protocolo utilizado. Martins y col., (2009) describieron una motilidad total de las muestras de 56.6 ± 10.3% tras 3 días de almacenamiento de los epididimos a 5 °C un valor muy superior a nuestro 10,28±8,53 %. La calidad seminal de partida era similar a la nuestra y la única diferencia evidente es de nuevo el origen de las muestras (matadero). Sin embargo, en nuestras muestras de matadero también hay una caída importante de la motilidad en las primeras 48 horas, lo que sugiere que la causa de la fuerte caída de motilidad en nuestro experimento pudiera estar en el procesado. Bertol y cols, (2013) almacenan los epididimos hasta 30 horas a 18°C, obteniendo una motilidad media del 41,25% a las 30 horas, un dato inferior al nuestro. La explicación más plausible, es que nuestro experimento se realizó con un gran número de muestras. Un total de 68 testículos frente a los 20 que reportan otros estudios (Bertol y cols, 2013, Posado Ferreras, 2014). La acumulación de

muestras en la nevera de almacenamiento, pudo hacer que se superase la potencia de enfriamiento de la misma y/o que las muestras dispuestas en las zonas más centrales, no se enfriasen a un ritmo adecuado, acelerándose los procesos de autólisis. También pudo producirse shock térmico por sobreenfriamiento en aquellas muestras más cercanas a la pared de la misma.

6. CONCLUSIONES

1. Se confirma la técnica de extracción seminal de epidídimo como una forma de criopreservación espermática del toro lidiado en la plaza.
2. Tras la muerte en la plaza, un porcentaje importante de animales (44,44%), no cumple unos mínimos de calidad seminal que garanticen una adecuada conservación espermática.
3. En nuestras condiciones experimentales, la conservación de los testículos a 5°C hasta 12-15 horas post-mortem, garantizó la calidad seminal de las muestras.
4. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, no es posible garantizar la viabilidad de las muestras más allá de las 15 horas de conservación.

1. The seminal extraction technique from epididymis is affirmed to be a way of cryopreserving male sperm.
2. After the bullfight, a significant percentage of dead animals (44.44%), do not meet the minimum seminal quality to ensure a good sperm conservation.
3. In our experimental conditions, preservation of the testes at 5 °C within 12-15 hours after the death in the run, guaranteed the seminal quality of the samples.
4. However, under our experimental conditions, it is not possible to guarantee the viability of the samples beyond 15 hours of storage.

7. VALORACION PERSONAL

La carrera universitaria es un camino de aprendizaje, superación y madurez; en mi opinión el trabajo de fin de grado es la forma ideal de culminar este trayecto, ya que utilizas todas tus aptitudes adquiridas durante estos años atrás para realizar un estudio experimental útil que te acerca un poco al mundo laboral próximo. No hay mayor satisfacción que tras duro trabajo laboratorial y personal hallar resultados significativos y útiles para tu campo.

Realizar este estudio me ha permitido adquirir conocimientos en el campo de la reproducción animal e iniciarme en el mundo de la investigación, el cual me parece fascinante.

Creo que la actitud de investigar es algo fundamental para la evolución del ser humano, no debemos perder nunca la libertad de la duda y la ambición de querer saber más de lo que está ya escrito.

Y concluiré citando a Miguel de Unamuno, Filósofo y escritor español (1864-1936) “ *La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante*”.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Amann, R.P., Almquist, J.O. (1961). Reproductive capacity of dairy bulls I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. I. J. Dairy Sci.; 44: 1537-1543.

Amann, R.P., Griel Jr, L.C. (1974). Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated semen. J. Dairy Sci.; 57(2):212-219.

Andraszek, K., Banaszewska, D., Czubaszek, M., Wójcik, E., Szostek, M., (2014). Comparison of different chromatin staining techniques for bull sperm. Arch. Tierz. 57, 1–15.

Ballachey, B., Hohenboken, W., Evenson, D. (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. Biol. Reprod.; 36:915- 925.

Bertol, Melina Andrea Formighieri, Weiss, Romildo Romualdo, Thomaz-Soccol, Vanete, Kozicki, Luiz Ernandes, Fujita, Aline Silva, Abreu, Renata Azevedo de, & Green, Kerriel

Thandile. (2013). Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20°C. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(5), 777-783

Cañón, J., Tupac-Yupanqui, I., García-Atance, M., Cortés, O., García, D., Fernández, J., Dunner, S. (2008). Genetic variation within the Lidia bovine breed. *Animal genetics*; 39(4): 439-445.

Cary, J.A; Madill, S; Farnsworth, K; Hayna, T.J; Duos, L; y, M.L. (2004) A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions.

Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. (2010) Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*. Aug;74(3):424-35.

Chenoweth, P.J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*; 64:457-468. Chohan, K., Griffin, J., Lafromboise M., De Jonge C., Carrell D. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.*; 27(1):53-59.

Chenoweth, P. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*. 2005 Aug; 64(3): 457–468. Enciso, M., Johnston, S.D., Gosálvez, J. (2011b). Differential resistance of mammalian sperm chromatin to oxidative stress as assessed by a two-tailed comet assay. *Reprod. Fertil. Dev.*; 23(5):633-637.

Fernández, J.L., Gosálvez, J., Santiso, R., Goyanes, V., López-Fernández, C. (2007). In: Valentino, R.G. (Ed.), *Adaptation of the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test to Determine DNA Fragmentation from Bull Sperm*. Nova Biochemical Books, New York. . 69-84.

Foote, R.H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables.

Glozzi, T.M., Zaniboni, L., Cerolini, S. (2011). DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*; 75(9):1613-1622.

Gorczyca, W., Gong, J., Darzynkiewicz, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.*; 53(8):1945-1951.

Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gouraud, A., Holt, H.V. (2011). Correlations between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from 11 species. *Mol Reprod De*; 78:951-961.

Hafez, C. (1989). Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª Ed. Interamericana Mc.Graw-Hill. Mexico. : 694.

Hoflack G1, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, Opsomer G, Duchateau L.(2006). Breeding soundness and libido examination of Belgian Blue and Holstein Friesian artificial insemination bulls in Belgium and The Netherlands. *Theriogenology*. 2006 Jul 15;66(2):207-16. Epub 2005 Dec 20.

Kumar, U., Gawande, A. P., Sahatpure, S. K., Patil, M. S., Lakde, C. K., Bonde, S. W., ... Ramteke, B. R. (2015). Assessment of semen quality in pure and crossbred Jersey bulls. *Veterinary World*, 8(10), 1266–1272.

Lu, K.H; Seidel, G.E; (2004). Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA*

Malcotti, V., Pelufo, V., Bergamo, N., Aisen, E. (2012). Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing–thawing. *Anim. Prod. Sci.*; 52:741-745.

Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M.R., Domínguez-Rebolledo, A.E., Estes, M.C., Garde, J.J. (2009). DNA status on thawed semen from fighting bull: A comparison

between the SCD and the SCSA tests. *Reprod. Domest. Anim.*; Martins, C. F., Driessen, K, Melo, P., Carvalho-Neto, J.O., de Sousa, R.V.,

Montes, F. "Paquiro"(1836) Tauromaquia completa o el arte de torear en plaza. Ed. Turner,1983, Madrid. 256.

Moreno, R.C; Boilard,M; Sullivan, R; Sirard, M.A. (2002). Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro.DOI:10.1002/mrd.10192

Oliveira RV, Dogan S, Belser LE, Kaya A, Topper E, Moura A, Thibaudeau G, Memili E. (2013). Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction* 2013; 146: 263–272.

Papa, P., Papa, F., Oliveira, L., Guasti, P., Castilho, C.&Giometti, I.(2015). Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 161:58-73

Purroy, A. (2003). Comportamiento del Toro de Lidia. En el campo, en el Ruedo. Ed. Universidad Pública de Navarra, Pamplona. 267.

Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R., Sirard, M. (2002). Caracterización and identification of epydidimal factors that protect ejuaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol. Reprod.*; 66(1):159-166.

Ribeiro-Peres, A, Munita-Barbosa, L, Yumi-Kanazawa, M, Mello-Martins, MI, & 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.

- Rodríguez Montesinos, A. (1995).** Selección, consanguinidad y cruzamientos. Influencias en las líneas y castas actuales. Ponencia: II Symposium Nacional del Toro de Lidia. Ed Comité Organizador Symposium Nacional del Toro de Lidia, Zafra. Badajoz. 45-50.
- Rodríguez, S., Goyanes, V., Segrelles, E., Blasco, M., Gosálvez, J., Fernández, J. (2005).** Critically Short Telomeres Are Associated With Sperm DNA Fragmentation. *Fertil Steril.*; 84(4): 843-845.
- Rodríguez-Martinez, H. (2007).** State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod. Fertil. Dev.*; 19:91-101.
- Rumpf, R., Dode M. (2009).** Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 uC by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.*; 116:50-57.
- Saacke, R.G. (2008).** Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. Virginia Polytechnic Institute and State University, Department of Dairy Science, Blacksburg, VA 24061 0315, United States.
- Saavedra, G, Mas, A., Sanes J. M., Vallejo, P., Matas, C, Seva J. I. . (2012).** Parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos postmortem en el toro de lidia. *Anales de Veterinaria de Murcia*, Vol. 28 (2012)
- Sánchez Israel V ; Aguiar A; Erosa S. ; Cervera D.; Avilés, V.; Navarrete L; Magaña, H; Baeza J; Ortiz de la Rosa B.; Ramón Ugalde J. (2003).** Congelación Postmortem de Semen de Toro Lidiado. INIFAP Yucatán.
- Santos, MAM, Gradela A, Moraes, EA. (2000).** Morphological changes in sperm cells of stallions of the nordestine breed after thawing. *Animal Reproduction* 12 (3), 537-537
- Slowinska, M., Karol, H., Cieresko, A. (2008).** Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. *Cryobiology*; 56: 100-102.

Stout, M.A. (2012). Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same Holstein bulls .Tesis Doctoral. Universidad de Louisiana, EEUU..

Van Der Horst, G, Seier, J. V. Spinks, A. C. Hendricks S. (1999). The maturation of sperm motility in the epididymis and vas deferens of the vervet monkey, *Cercopithecus aethiops*. Int J Androl. 1999 Jun; 22(3): 197–207.

Vishwanath, R (2003).Artificial insemination: the state of the art 2003

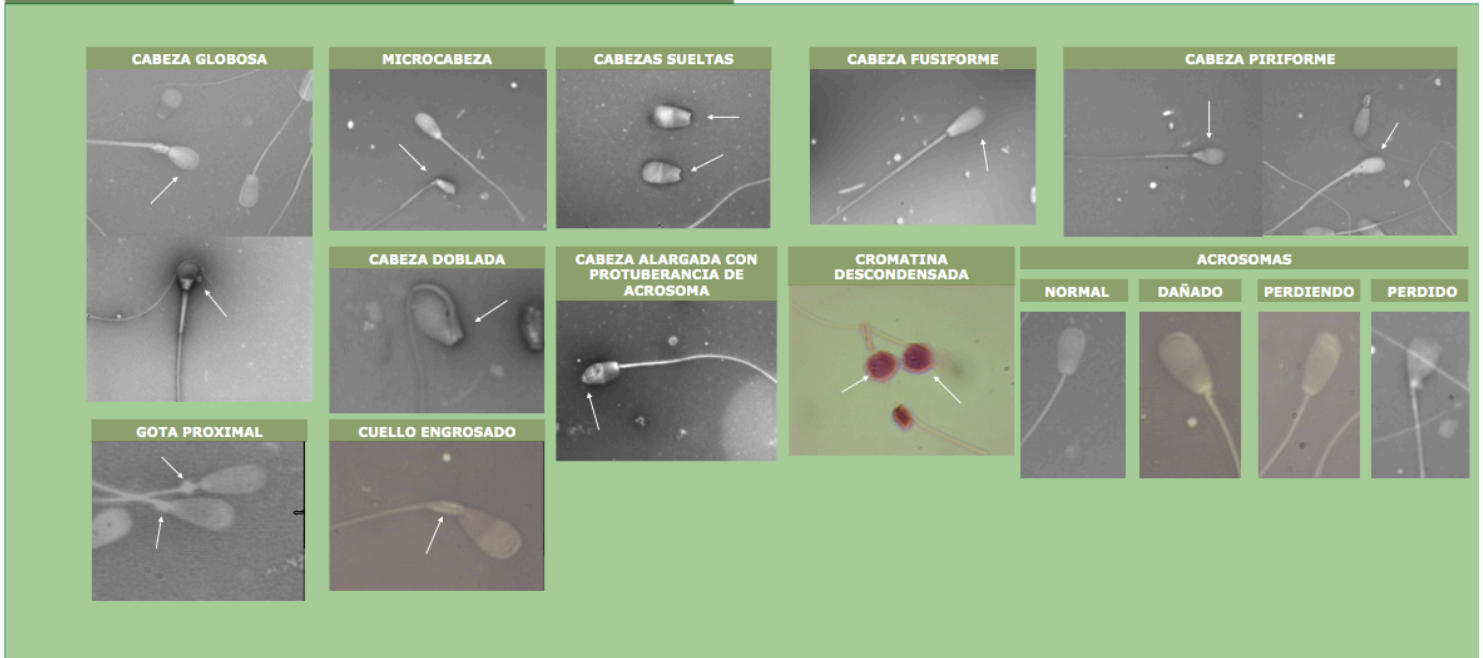
Walters, Anneke H; Eyestone, Willard E; Saacke, R. G; Pearson, R. E; Gwazdauskas, F. C. (2004). Sperm Morphology and Preparation Method Affect Bovine Embryonic Development

Way, A.L.; Griel, L.C., Killian, G.J. (2000). Effects of accessory gland fluid on viability, capacitation and acrosoma reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. J. Androl.; 21: 213-219.

ANEXO I

Capturas de anomalías morfológicas de cola y cabeza realizadas durante el estudio.

ANOMALIAS CABEZA



ANOMALIAS COLA

