

Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros *postmortem* obtenidos mediante lavado retrógrado

María I. Albers Alvarez* y Diego R. Barrios Arismendi

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la movilidad individual de los espermatozoides presentes en la cola del epidídimo, obtenida del matadero mediante lavado retrógrado de testículos de toros cebú *postmortem*. Los testículos fueron recolectados al azar (n=90) y transportados bajo dos diferentes temperaturas, siguiendo dos diferentes protocolos: Protocolo 1 (T: 35°C) y Protocolo 2 (T: 25°C), durante el período Abril-Julio 2003. El material experimental fue transportado según el protocolo elegido al azar, desde el sitio de recolección hasta el laboratorio en un lapso comprendido entre 30 y 60 minutos. Se realizó histopatología para seleccionar los testículos que tuvieran 70% o más de tejido funcional para cada protocolo (Protocolo 1: n=13; y Protocolo 2: n=20). Una vez realizada la selección, se evaluó la movilidad individual de los espermatozoides recolectados de las colas epididimarias en los testículos seleccionados. Esta recolección se realizó por lavado retrógrado con Tris-yema-glicerol, a través del conducto deferente. Para cada Protocolo se hicieron dos lecturas de la movilidad individual espermática (MI1 y MI2), con intervalo de 1 hora entre cada lectura. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva y se realizó una prueba de *t* para comparar dos muestras independientes. Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los dos Protocolos en el comportamiento de la movilidad individual. Esto nos indica que la temperatura de transporte no afectó la movilidad espermática epididimaria y que es posible recolectar espermatozoides vivos de la cola del epidídimo de toros *postmortem*.

Palabras clave: espermatozoide, epidídimo, toro, *postmortem*.

* Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua. * Correo electrónico: marisabelalbers@yahoo.es

Individual motility of epididymal spermatozoa, obtained by retrogradous flushing from *post-mortem* zebu bull testicles

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the individual motility of the spermatozoa of the epididymal tail, obtained by retrogradous flushing, from testicles of *post mortem* bulls collected from a slaughterhouse. The testicles (n=90) were randomly collected and transported under two different temperatures, following two different protocols: Protocol 1 (35°C) and Protocol 2 (25°C), during the April-July 2003 period. The testicles were transported from the slaughterhouse to the Laboratory, in a range of time between 30 and 60 minutes. A histopathological study was conducted to all testicles to select those with 70% or more of functional tissue. So, the final number of testicles for the study was reduced: for Protocol 1 to 13 testicles and for Protocol 2 to 20 testicles. The retrogradous flushing was done with Tris-egg yolk-glycerol medium, through the deferent duct. Two readings for motility were done for each protocol (MI 1 and MI 2) one hour apart. The data was analyzed by descriptive statistic and *t* test to compare two independents samples. There was no significant difference ($P<0.05$) between protocols on individual motility. This shows that, in this case, two different temperatures did not affect the individual motility of the spermatozoa of the epididymal tail, and it is possible to obtain live spermatozoa from testicles from *post mortem* bulls.

Key words: spermatozoa, epididymal, bull, *post-mortem*.

INTRODUCCIÓN

La recolección de semen de toros por métodos convencionales, como la vagina artificial y el electro-eyaculador, 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 élites 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 *postmortem*, 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: la maduración y el almacenamiento espermático (Chenoweth, 1997; Mortimer, 1997). La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y el almacenamiento ocurre en la cola del epidídimo (Amann y Schanbacher, 1983; Robaire y Hermo, 1988; Robaire y Viger, 1995). Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo con movilidad y capacidad fertilizante, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial.

En la literatura científica revisada no se encontró ningún reporte del nacimiento de becerros originados de espermatozoides frescos o congelados recolectados de la cola del epidídimo de toros *post mortem*; aunque ha habido algunos avances con espermatozoides bovinos epididimarios usados en fresco para fertilización *in vitro* (Chung, 1997; Songsasen *et al.*, 1998; Garde *et al.*, 1995) y en la congelación de espermatozoides de la cola del epidídimo de ratas (Nakatsukasa *et al.*, 2001), caninos (Hewitt *et al.*, 2001), felinos (Axné *et al.*, 1998; Axné *et al.*, 1999) y venados (Zomborszky *et al.*, 1999).

En consecuencia, este trabajo preliminar - y pionero - establece como propósito de investigación, la obtención de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros *post mortem* para evaluar su viabilidad y utilizar este procedimiento en aquellos casos donde ocurra muerte súbita de toros reproductores valiosos, como se apuntó anteriormente.

Así, el objetivo de este trabajo es evaluar la movilidad individual de los espermatozoides de la cola del epidídimo de toros *postmortem*, obtenidos mediante la técnica de lavado retrógrado, en testículos transportados según dos diferentes protocolos de temperaturas. El alcance del objetivo general se fundamenta en los siguientes objetivos específicos: a) evaluar la movilidad individual de los espermatozoides epididimarios en dos momentos diferentes: post lavado o Movilidad individual 1 (MI1), y post incubación o Movilidad Individual 2 (MI2), y b) evaluar el efecto de la temperatura del instrumento de transporte de los testículos desde su sitio de recolección hasta el de procesamiento, sobre la movilidad individual.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección y transporte de los testículos *postmortem*.

Se recolectaron (entre Abril y Julio 2003) un total de 45 pares de testículos, en 15 visitas al Matadero Industrial de Turmero, estado Aragua, Venezuela. Los testículos fueron recolectados de machos cebuinos procedentes de Barinas y el Sur del Lago de Maracaibo, pero desconocemos datos específicos de ellos, tales como el régimen de alimentación. Sólo se pudo determinar, a la observación de los toros en los rieles de matanza, que eran machos de raza Brahman de diferentes grados de pureza y con una edad estimada entre los dos y cinco años.

En cada visita al Matadero se recolectaron tres pares de testículos y se cumplieron siempre los mismos pasos, con la única diferencia que un grupo de los testículos (20 pares) se transportó en una cava con una temperatura de 35° C (protocolo “tibio” o 1), y el otro (25 pares) a una temperatura de 25° C (protocolo “frío” o 2), según los dos protocolos seguidos para este estudio.

Los pasos que se siguieron fueron:

1. Recolección de las bolsas escrotales (con sus dos testículos incluidos) del riel de matanza, pocos segundos (entre 10 y 20) después de la muerte del toro.

2. Cada bolsa escrotal fue limpiada profusamente con toallas de papel y se colocó cada una de ellas dentro de bolsas plásticas selladas (tipo “zip-lock”) e identificadas, y estas a su vez se colocaron en una cava con temperatura inicial (evaluada por termómetro) de 35 o 25°C, según el protocolo correspondiente. Para lograr los 35°C se usaron “fomenteras” llenas con agua tibia, sobre las cuales se dispusieron rollos de papel periódico como aislantes y sobre estos se ubicaron las bolsas escrotales para el transporte de las muestras hacia el laboratorio. 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 tomaron todas las medidas posibles para evitar que esto ocurriera. Por otro lado, para lograr los 25°C se colocaron en la cava dos “recipientes plásticos de hielo líquido”, igualmente aislados con periódico.

3. El transporte de los testículos al laboratorio de la FCV-UCV demoró entre 30 a 60 minutos.

4. Cada bolsa escrotal se identificó con el número correlativo correspondiente al orden en que fueron recolectados, además de la fecha y hora exactas de la recolección.

5. El tiempo transcurrido desde la recolección de los testículos en el matadero, hasta el procesamiento de cada uno de ellos en el laboratorio, se registró en una planilla diseñada para tal fin.

6. La circunferencia escrotal se determinó con una cinta métrica.

7. Cada testículo se pesó (con una balanza) y se midió su largo y ancho (con un vernier).

8. Cada epidídimo se pesó (con una balanza) y se midió su largo y ancho (con un vernier).

2. Recolección de espermatozoides epididimarios por flujo retrógrado.

Los testículos bovinos recolectados en el matadero fueron procesados en el Laboratorio del Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial (IRAIA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Central de Venezuela, en Maracay, estado Aragua. Los espermatozoides epididimarios se recolectaron según el protocolo referido por los Drs. G. Flores-Foxworth y B. Foxworth de la Universidad de Texas A&M (EE.UU.) (comunicación personal), que consiste en un lavado por flujo retrógrado.

Para realizar el lavado epididimario por flujo retrógrado se siguieron los siguientes pasos y en cada caso se anotó la hora de inicio de la recolección de espermatozoides del epidídimo:

1. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se disecaron mediante el uso de implementos y técnicas asépticas. Se removió la túnica serosa testicular y los vasos sanguíneos con un bisturí con hojilla N° 10 y tijera recta.

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

3. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocó en una placa de Petri precalentada a 37°C (en una platina calentadora) y se mantuvo la porción libre de los vasos deferentes firmemente sujeta con los dedos pulgar e índice.

4. Las agujas para el lavado (de diferentes calibres) fueron preparadas limándole las puntas para hacerlas “romas”. Se colocó una de esas agujas (calibre 20, 21, 22, o 23, según el diámetro interno de cada vaso deferente) dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptó una jeringa (tipo “air-tite” de 5 mL) llena con “medio de lavado” (medio de congelación Tris yema glicerol) y con esta jeringa se perfundió lentamente dentro del lumen del cada vaso deferente. Las paredes de los vasos deferentes se pinzaron con una pinza “mosquito” contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado.

5. A medida que se perfundían los vasos deferentes con el medio de lavado se observó un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, apareció en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario, representado por un líquido espeso y de un color crema pálido o blanco cremoso, dependiendo de la concentración espermática obtenida.

6. Se hicieron dos lecturas de la movilidad individual espermática: una post lavado, inmediatamente después de recobrado el fluido (movilidad individual 1 o MI1), y otra post incubación, dentro de la hora post-recolección (movilidad individual 2 o MI2). Esto se fundamentó en que los parámetros de movilidad individual y movimientos progresivos espermáticos epididimarios adquieren su mejor expresión después de 40 minutos a una hora. La razón por la que después de ese tiempo hay una mejor medida de movilidad espermática epididimaria se estima que sea debido a una disminución del efecto supresorio que ejercen los fluidos epididimarios sobre esos espermatozoides, y la reoxigenación y dilución durante el proceso de recolección espermática (Brooks, 1979).

3. Histopatología testicular

Los testículos recolectados fueron evaluados histológicamente con el propósito de seleccionar para el presente estudio solo aquellos con tejido funcional igual o mayor al 70% de su parénquima, que no tuvieran degeneración severa ni atrofia testicular, para descartar las lesiones testiculares como causal de cualquier anomalía o defecto de los espermatozoides epididimarios. El procedimiento que se usó fue el descrito por Bermúdez (2002).

Los resultados se expresaron según la funcionalidad o las alteraciones encontradas en cada testículo de la siguiente manera:

a) *Testículo funcional*: aquel que se diagnosticó con 70% o más de túbulos seminíferos normales, según la evaluación microscópica del tejido testicular.

b) *Testículo con degeneración*: aquel que se diagnosticó con menos de 70% de tejido funcional y evidencias de algún grado de engrosamiento de la membrana basal del túbulo seminífero, fibrosis intersticial, y la espermatogénesis afectada, bien sea en la espermatocitogénesis, en la espermiogénesis, o en ambas.

c) *Testículo con atrofia*: aquel que se diagnosticó con algún grado de atrofia, evidenciada por la disminución en el diámetro de los túbulos seminíferos, acompañada de fibrosis intersticial severa, y afección de la espermatocitogénesis en cualquiera de sus etapas.

4. Evaluación de la Movilidad Individual

La Movilidad Individual se determinó mediante la observación al microscopio óptico (400X) del porcentaje de células móviles (0-100%) en la muestra (Society For Theriogenology, 1983). Este parámetro se evaluó en dos eventos de tiempo diferentes: el primer momento (MI1) ocurrió reciente a la recolección de la muestra de espermatozoides epididimarios; y el segundo (MI2), dentro de aproximadamente una hora después de la primera evaluación.

5. Análisis estadístico

Se usó un diseño completamente aleatorizado con dos tratamientos de temperatura: protocolo 1 y protocolo 2, incluyendo sólo los testículos funcionales, según la evaluación histopatológica.

Es importante destacar que el descarte de testículos no estaba previsto originalmente debido a que eso implicaba una reducción del número de muestras a analizar. Y se debe enfatizar que eso no eliminó el carácter aleatorio del trabajo por haberse mantenido el grupo reducido dentro de su grupo original.

El descarte fue necesario realizarlo para:

1. Poder atribuir cualquier falla, funcional o morfológica, de los espermatozoides epididimarios procesados sólo a problemas relacionados con nuestro estudio, y no a deficiencias originadas en el tejido testicular.

2. Tener un punto de referencia sobre el total de las muestras procesadas, en virtud de desconocer detalles sobre el origen de los toros del matadero.

En consecuencia, el número de testículos estudiados para el Protocolo 1 (35°C) fue de 13 debido a que se descartaron aquellos testículos que presentaron alteraciones de la normalidad, según estudios histopatológicos (n = 27), que pudieran afectar el desarrollo y funcionalidad de los espermatozoides epididimarios, y por tanto se pudiera sesgar el objetivo del trabajo. Igualmente, para el Protocolo 2 (25°C) se estudiaron sólo 20 testículos debido a que, como en el Protocolo 1, se descartaron testículos por la misma causa (n = 30). Con este criterio se pretende atribuir cualquier anomalía o deficiencia en la calidad de esos espermatozoides sólo a fallas o eventos ocurridos en el epidídimo, o durante el transporte y procesamiento de los testículos.

En este estudio se comparó el protocolo de lavado retrógrado para cada protocolo de temperatura.

Los datos obtenidos en cada protocolo fueron evaluados mediante estadística descriptiva (Ott, 1977), y los resultados se presentan mediante figuras y cuadros. También se usó la "Prueba de t" para comparar dos muestras independientes. Para la aplicación de los análisis se utilizaron los paquetes estadísticos Statistics 7.0 y SAS (SAS, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se indicó en los Materiales y Métodos, los hallazgos histopatológicos permitieron hacer tres grupos con los testículos recolectados en el matadero, según el tejido testicular observado: funcionales, degenerados y atróficos. Así, del total de testículos recolectados (n=90), la proporción de *testículos funcionales* fue de 36,7% (33/90); la proporción de *testículos degenerados* fue de 43,3 (39/90) y la proporción de *testículos atróficos* fue de 20,0% (18/90).

Como dato adicional, en todos los testículos se evaluaron las medidas de circunferencia escrotal (con los testículos dentro de las bolsas escrotales), largo, ancho antero-posterior y peso testicular; así como el largo, ancho (eje mayor) y peso de la cola epididimaria. Los testículos seleccionados para el presente estudio (n=33) tuvieron las medidas que se presentan en el Cuadro 1. Las medidas observadas en el Cuadro 1 se corresponden con los promedios reportados por otros autores anteriormente, para machos cebuños (Sudheer, 2000; Chacón *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Características morfométricas de testículos y colas epididimarias

Variable	Media	EE
Circunferencia Escrotal (cm)	31,80	0,47
Ancho testicular (cm)	5,56	0,11
Largo testicular (cm)	11,36	0,22
Peso testicular (gr)	267,12	12,03
Ancho de la cola del epidídimo (cm)	1,58	0,07
Largo de la cola del epidídimo (cm)	1,92	0,06
Peso de la cola del epidídimo (gr)	30,06	1,57

Evaluación de la Movilidad Individual

Los resultados obtenidos de la evaluación de la movilidad individual en los Protocolos 1 y 2 se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Movilidad Individual de espermatozoides epididimarios recolectados en los Protocolos 1 y 2

Variable	n	Mínimo	Máximo	Media	Varianza	EE	Prueba <i>t</i>
		----- % -----					
Prot. 1	MI 1	0	40	17,46	226,10	15,03	aA†
	MI 2	10	55	34,23	111,85	10,57	aA
Prot. 2	MI 1	0	40	8,95	117,31	10,83	aB
	MI 2	1	50	26,8	155,85	12,48	aB

† Letras minúsculas comparan medias entre MI para el mismo Protocolo y letras mayúsculas comparan medias entre Protocolos.

Efecto de la temperatura del instrumento de transporte sobre la Movilidad Individual de espermatozoides epididimarios

Se compararon estadísticamente los resultados obtenidos en la evaluación de la movilidad individual en cada protocolo de temperatura. La movilidad individual al momento de la primera lectura (MI1) no tuvo diferencia significativa ($P>0,05$) entre los dos protocolos, al igual que tampoco hubo diferencia significativa ($P>0,05$) entre las movilidades individuales tomadas como segunda lectura (MI2). Lo anterior indica que, en este trabajo, la temperatura del instrumento de transporte no fue un factor influyente sobre la movilidad de los espermatozoides epididimarios.

Además, la media estadística al momento de la primera evaluación de movilidad espermática (MI 1) fue menor ($P<0,01$) en ambos protocolos (P1: 17,46%; P2: 8,95%) que la movilidad al momento de la segunda evaluación (MI 2), que fue entre dos y tres veces mayor (P1: 34,23%; P2: 26,8%). Esto indica que la movilidad de los espermatozoides epididimarios se activa después de un tiempo, y confirma lo señalado por otros autores (Brooks, 1979, Usselman y Cone, 1983).

El tiempo que se requiere para la activación de los espermatozoides epididimarios se ha asociado, en la mayoría de las especies, con el hecho que los espermatozoides, una vez formados en el testículo se mezclan con fluidos epididimarios donde permanecen inmóviles y con un nivel de metabolismo muy bajo. Esto puede interpretarse como una necesidad de preservar las reservas energéticas espermáticas y para disminuir los riesgos de alteraciones de membrana, estructuras internas y composición bioquímica, por efecto de agentes oxidantes endógenos producidos por la actividad mitocondrial (Brooks, 1979, Voglmayr *et al.*, 1985; Robaire y Viger, 1995).

En la mayoría de las especies estudiadas los espermatozoides permanecen inmóviles en la parte baja del epidídimo hasta diluirse en el medio adecuado que le imprime los cambios para alcanzar su máximo movimiento (Johnson y Everitt, 1980; Amann y Schanbacher, 1983; Usselman y Cone, 1983; Robaire y Viger, 1995).

Adicionalmente, se ha demostrado que existe una relación importante entre la presencia de una glicoproteína secretada por el epidídimo, la HE5 o CD52 y la movilidad de los espermatozoides eyaculados (Derr *et al.*, 2001). Ahora bien, la influencia de esta glicoproteína sobre la movilidad espermática está directamente correlacionada con su funcionalidad en la superficie de los espermatozoides: A mayor funcionalidad, mayor movilidad. Sin embargo, no se ha demostrado esa relación directa entre la concentración

de la glicoproteína en el plasma seminal y los parámetros convencionales del semen (movilidad, concentración y morfología) (Derr *et al.*, 2001).

En trabajos *in vitro*, los espermatozoides adquieren movilidad cuando son mezclados con secreciones de las glándulas sexuales accesorias (Derr *et al.*, 2001), lo que indica que es normal que los espermatozoides epididimarios sean inmóviles o poco móviles hasta tanto ocurran ciertas condiciones que permiten el total desarrollo de su movilidad potencial. Además se ha atribuido la pérdida de la movilidad a la disminución del intercambio de oxígeno durante la recolección de la muestra en trabajos *in vitro*, pero se restablece cuando esta se diluye en los medios de lavado (Brooks, 1979)

En este estudio, en la lectura de movilidad espermática para cada uno de los epidídimos en ambos protocolos, hubo casos en donde la MI 1 fue cero. Una mayor ocurrencia de ello se observó en P2, lo que pudiera explicarse como una tendencia de los espermatozoides epididimarios a permanecer más aletargados cuando se transportan en ambiente refrigerado (P2).

Las dos lecturas de movilidad que se hicieron no mantuvieron un patrón uniforme, es decir, el incremento del porcentaje de movilidad en la segunda lectura (MI2) fue variable. Esto pudiera relacionarse con la variabilidad entre toros de matadero, no reproductores, y más aún en este estudio en el que desconocemos el origen específico de esos machos destinados al consumo y que entendemos han podido tener una dieta para engorde que pudiera haber afectado, de alguna manera su capacidad reproductora.

CONCLUSIONES

Los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo de toros *post mortem* evidenciaron sobrevivencia, aunque tienen menor movilidad que los del semen bovino recolectado por métodos convencionales.

Los espermatozoides epididimarios siempre tuvieron una mayor movilidad individual en la segunda lectura de cada muestra, es decir, una hora post-lavado del epidídimo. Esto confirma la necesidad de dilución del ambiente epididimario de esos espermatozoides para poder alcanzar su plena movilidad.

El método de recolección utilizado fue eficiente y repetible, aunque se necesita mayor investigación para determinar la influencia que este método pudiera tener sobre la cantidad y calidad de espermatozoides epididimarios recolectados.

La movilidad individual de los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo no fue influida por la temperatura del instrumento de transporte.

LITERATURA CITADA

- Amann R.P. y B.D. Schanbacher. 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.*, 57(Suppl. 2): 380-403.
- Axnér E., B. Ström y C. Linde-Forsberg. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*, 50: 767-778.
- Axnér E., C. Linde-Forsberg y S. Einarsson. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, 52: 973-979.
- Bermúdez V. 2002. Patología de la reproducción en el semental bovino de doble propósito. *En* González Stagnaro C., E. Soto Belloso y L. Ramírez Iglesia (Eds.) *Avances en la Ganadería Bovina de Doble Propósito*. Ediciones Astro Data. Maracaibo, Venezuela. pp 528-546.
- Brooks D.E. 1979. Biochemical environment of sperm maturation. *En* Fawcett D.W. y Bedford J.M. (Eds). *The Spermatozoon*. Baltimore_Munich: Urban and Schwarzenberg. pp 23-34.
- Chacón J., E. Pérez y H. Rodríguez-Martínez. 2002. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermiogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. *Theriogenology*, 58 (1): 41-50.
- Chenoweth P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. *En* Youngquist R.S. (Ed.) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders, pp. 217- 229.

- Chung J. 1997. Effects of sperm treatments on fertilization and in vitro development of bovine follicular oocytes. *Korean J. Emb.Trans.*, 12(2): 189-194.
- Derr P., Ch. Yeung, T. Cooper y C. Kirchhoff. 2001. Synthesis and glycosylation of CD52, the major "maturation-associated" antigen of rat spermatozoa, in the cauda epididymidis. *Reproduction*, 121(3): 435-446.
- Garde J., S. Perez, M. Aguado, E. Ayllon, D. Garrido y V. Montoro. 1995. Live birth of hybrid (*O. musimon* x *O. aries*) lambs following intrauterine insemination in domestic sheep with muflon semen obtained 40 hours postmortem. *Theriogenology*, 43(1): 1-372.
- Hewitt D., R. Leahy, I. Sheldon y G. England. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 67(1-2): 101- 111.
- Johnson M. y B. Everitt. 1980. *Essential Reproduction*. Blackwell. Londres.
- Mortimer S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Repr. Update*, 3(5): 403-439.
- Nakatsukasa E., T. Inomata, T. Ikeda, M. Shino y N. Kashiwazaki. 2001. Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Reproduction*, 122(3): 463-467.
- Ott L. 1977. *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*. Duxbury Press. New York.
- Reyes-Moreno C., A. Gagnon, R. Sullivan y M. Sirard. 2000. Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J Androl.*, 21(6): 876-886.
- Reyes-Moreno C., M. Boilard, R. Sullivan y M. Sirard M. 2002. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol. Reprod.*, 66(1): 159-166.

- Robaire B. y L. Hermo. 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: Structure functions and their regulation. *En* Knobil E. y J. Neill. (Eds) The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York. pp 999-1080.
- Robaire B. y R. Viger. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.*, 52: 226-236.
- SAS Institute. 1985. SAS user`s guide. Statistics. 5ta ed. SAS Inst., Cary, NC.
- Society for Theriogenology. 1983. Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls. *J. Soc. Theriogenology*, 12: 38-41.
- Songsasen N., J. Tong y S. Leibo. 1998. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatoa retrieved up to twenty-four hours after death. *J. Exp Zool.*, 280(2): 189-196
- Sudheer S. 2000. Relationship between testicular size and seminal attributes in crossbred bulls. *Indian J. Anim. Res.*, 34(2): 159-160.
- Usselman M. y R. Cone. 1983. Rat sperm and mechanically inmovilized in the cauda epididymis by "inmobilin", a high molecular weight glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 29: 1241-1253.
- Voglmayr J., R. Sawyer y J. Dacheux. 1985. Glycoproteins: a variable factor in surface transformations of ram spermatozoa during epididymal transit. *Biol. Reprod.*, 33: 165-176.
- Zomborszky Z., T. Zubor, J. Toth y P. Horn. 1999. Sperm collection from shot Red Deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilization of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta Vet. Hung.*, 47(2): 263-270.