

CONCENTRACIÓN Y MORFOLOGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS OBTENIDOS DE TOROS POSTMORTEM

Concentration and Morphology of the Epididymal Spermatozoa from Post Mortem Bulls

María I. Albers^{*1} y Diego R. Barrios^{*}

**Departamento de Producción e Industria Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563,
Maracay, 2101A, estado Aragua, Venezuela.*

Correo-E:marisabelalbers@yahoo.es

Recibido: 27/04/11 - Aprobado: 07/12/11

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la concentración y la morfología de los espermatozoides de la cola del epidídimo de testículos de toros *postmortem*, obtenidos mediante lavado por flujo retrógrado, se recolectaron al azar 90 testículos, los cuales fueron transportados bajo dos diferentes temperaturas, siguiendo dos protocolos diferentes: Protocolo 1 (35°C) y Protocolo 2 (25°C), durante el período abril-julio 2003. El material experimental fue transportado desde el sitio de la recolección hasta el laboratorio, en un lapso comprendido entre 30 y 60 min con un promedio de 45 min. Se realizó histopatología para seleccionar los testículos con 70% o más de tejido funcional para cada protocolo (Protocolo 1: n=13; y Protocolo 2: n=20). Una vez realizado el descarte de aquellos testículos que no cumplieron con esa premisa, se evaluó la concentración espermática y la morfología de los espermatozoides de las colas epididimarias en los testículos seleccionados. La recolección de esos espermatozoides se realizó por lavado retrógrado con TRIS-yema-glicerol, a través del conducto deferente. Se determinó la concentración espermática mediante la cámara de Neubauer, en el fluido espermático y la morfología espermática se determinó en función del porcentaje de espermatozoides normales y de las atipias encontradas, previa tinción con Hema

ABSTRACT

In this investigation, the concentration and morphology of spermatozoa of the epididymal tail of post mortem bull testicles, obtained by retrograde flushing, were evaluated. The experiment was done from April-June 2003. Ninety testicles were randomly collected and transported to the laboratory, following two different temperature protocols: Protocol 1 (35°C) and Protocol 2 (25°C). The testicles were transported from the slaughterhouse (Frogorífico Industrial de Turmero, the State of Aragua, Venezuela) to the laboratory within a time frame of 30-60 min, with an average time of 45 min. For each protocol (Protocol 1, n=13; Protocol 2, n=20), a histopathological study of all samples was performed and those testes with 70% or more of functional tissue were selected. After discarding the testicles which did not comply with the required conditions, the spermatic concentration and morphology of spermatozoa were assessed. Spermatozoa collection was carried out by retrograde flushing using TRIS-egg yolk glycerol medium through the deferent duct. The spermatic concentration was obtained using the Neubauer chamber while the spermatic morphology was estimated by observation of smears stained with Hema III, and comparing the percentage of normal versus abnormal spermatozoa. The data

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

III. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva, y se realizó una prueba de *t* de Student para comparar muestras independientes. Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencia significativas, entre los dos protocolos en la morfología normal, ni el total de atipias. Según este estudio, la temperatura de transporte no afecta la calidad espermática epididimaria.

(Palabras clave: Concentración, morfología animal, espermatozoides, toro, epididimo, evaluación)

was analyzed by descriptive statistics and the *t* test was applied to compare two independent samples. The results obtained showed no statistical significant differences between the two protocols, regarding normal morphology and total percentage of abnormal spermatozoa. It is concluded that the two different temperature protocols do not affect the quality of spermatozoa of the epididymal tail.

(Key words: Concentrating, animal morphology, spermatozoa, bulls, epididymis, evaluation)

INTRODUCCIÓN

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. No obstante, 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*. Se podría implementar 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; 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 mismo (Amann y Schanbacher, 1983). 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, los cuales podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial.

No existen reportes del nacimiento de becerros originados de espermatozoides frescos o congelados recolectados de la cola del epidídimo de toros *post*

mortem; aunque han habido algunos avances con espermatozoides epididimarios de toro, ratón y muflón usados en fresco para fertilización *in vitro* (Chung, 1997; Garde *et al.*, 1995; Songsasen *et al.*, 1998, respectivamente) 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.*, 1999) y venados (Zomborszky *et al.*, 1999).

En consecuencia, la obtención de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros *postmortem*, podría permitir la evaluación del potencial fertilizante de estos espermatozoides, y utilizar este procedimiento en aquellos casos en los cuales ocurra muerte súbita de toros reproductores valiosos.

El objetivo de este trabajo fue el de evaluar la morfología y la concentración de los espermatozoides de la cola del epidídimo de toros *postmortem*, obtenidos mediante lavado retrógrado, en testículos transportados mediante dos diferentes protocolos de temperatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y transporte de los testículos postmortem

Se recolectó un total de 45 pares de testículos, en 15 visitas al Matadero Industrial de Turmero, estado Aragua, Venezuela. Los testículos fueron recolectados de toros cebuínos procedentes de Barinas y el Sur del Lago de Maracaibo, desconociéndose datos específicos de ellos, tales como régimen de alimentación, edad, sanidad, entre otros. Sólo se pudo

determinar, a la observación de los toros en los rieles de matanza, que eran machos cebuinos mestizos, con una edad estimada entre los dos y cinco años, según las estadísticas disponibles en el matadero, que beneficia 300 bovinos por día, aproximadamente.

En cada visita al matadero, se recolectaron tres pares de testículos al azar, siguiéndose el mismo procedimiento, y se distribuyeron en dos grupos: grupo 1 y grupo 2. En el grupo 1, los testículos (20 pares) se transportaron en una cava de anime a una temperatura de 35°C (protocolo “tibio” o P1), y el grupo 2 (25 pares) a una temperatura de 25°C (protocolo “frío” o P2). Se seleccionaron dos diferentes temperaturas para evaluar su efecto sobre la motilidad individual (Albers y Barrios, 2006) y la morfología de los espermatozoides recolectados.

Se recolectaron las bolsas escrotales (con sus testículos incluidos) de los toros, en el riel de matanza. La recolección se realizó entre 10 y 20 seg después de la muerte del toro. Cada bolsa escrotal se limpió profusamente con toallas de papel y se colocó dentro de bolsas plásticas, identificadas con el número correlativo correspondiente al orden en que fueron recolectadas, además de fecha y hora exactas de la recolección. Las bolsas escrotales se colocaron en una cava de anime con temperatura controlada por termómetro de 35° ó 25°C, según el protocolo correspondiente. Para lograr la temperatura de 35°C se usaron “fomenteras” con agua tibia, encima de las cuales se dispuso papel periódico como aislante, y sobre éste se ubicaron las bolsas escrotales para el transporte de las muestras hacia el laboratorio. Para lograr la temperatura de 25°C se colocaron en la cava dos paquetes de gel frío, igualmente aislados con papel periódico. El transporte de los testículos al laboratorio demoró entre 30 a 60 min con un promedio de 45 min. Una vez en el laboratorio, antes de comenzar con la recolección espermática, se determinó la circunferencia escrotal con una cinta métrica, se pesaron los testículos con una balanza *Mobba*, y se midió largo y ancho de cada testículo y cada epidídimo, con un vernier.

Recolección y evaluación de espermatozoides epididimarios por lavado retrógrado

Los testículos fueron procesados en el laboratorio del Instituto de Reproducción Animal (IRA) “Dr. Abraham Hernández Prado” de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad Central de Venezuela, en Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Los espermatozoides epididimarios se recolectaron según el protocolo referido por Gutiérrez *et al.* (2004) que consiste en un lavado por flujo retrógrado; en cada caso se anotó la hora de inicio de la recolección de espermatozoides de cada epidídimo. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se disecaron mediante el uso de implementos y técnicas asépticas. Se localizó el *septum* del epidídimo, correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del mismo, sitio en el cual se realizó un corte transversal con bisturí, justo antes del sitio donde el diámetro del epidídimo se reduce, para obtener el mayor número de espermatozoides posibles. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocó en una placa de Petri, precalentada a 37°C. Se colocó una aguja preparada previamente con la punta roma, calibre 20 G, 21 G, 22 G, o 23 G, 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) contentiva con medio de lavado (medio de congelación Tris-yema-glicerol), perfundiéndose lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. Las paredes de los vasos deferentes se fijaron con una pinza mosquito contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado. A medida que se perfundía el medio a través de los diferentes vasos, 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 el contenido epididimario, representado por un líquido espeso y de un color crema pálido o blanco cremoso, dependiendo de la concentración espermática obtenida.

La concentración espermática se determinó usando el hemocitómetro (cámara de Neubauer) previa dilución de la muestra (1:100 v:v) en glutaraldehído al 2%. La morfología se evaluó mediante las técnicas tradicionales de evaluación morfológica (frotis teñido con Hema-III®, observado al microscopio de contraste de fases) estableciéndose el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y el porcentaje de los espermatozoides con atipias (Mortimer, 1997).

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

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

siguiente manera: Testículo funcional: aquel que se diagnosticó con más del 70% de túbulos seminíferos normales, según la evaluación microscópica del tejido testicular. Testículo con degeneración: aquel que se diagnosticó con menos del 70% de tejido funcional y evidencias de algún grado de engrosamiento de la membrana basal del túbulo seminífero, fibrosis intersticial, y espermatogénesis afectada. 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.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la concentración espermática se realizó un diseño completamente aleatorizado incluyendo solo los testículos funcionales según la evaluación histopatológica.

Para evaluar la morfología espermática epididimaria, se usó un diseño completamente aleatorizado con dos tratamientos de temperatura: Protocolo 1 (P1), y Protocolo 2 (P2), incluyendo al igual que en la evaluación de la concentración espermática, sólo los testículos funcionales.

Se estudiaron 13 testículos en el P1 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 P2 se estudiaron sólo 20 testículos debido a que, como en el P1, 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 (media). También, se usó la "Prueba de t" para comparación de dos muestras independientes (Ott, 1977). Para la aplicación de los análisis se utilizó el programa SAS 8,2 (SAS Institute Inc., EUA, 2001). (Albers y Barrios, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hallazgos histopatológicos permitieron agrupar en tres grupos los testículos recolectados en el matadero, según el tejido testicular observado. Así, del total de testículos recolectados (n=90), la proporción de testículos funcionales fue de 36,66% (33/90); la proporción de testículos degenerados fue de 43,33% (39/90); y la proporción de testículos atróficos fue de 20% (18/90).

En todos los testículos recolectados no se evidenció correlación entre los hallazgos histopatológicos y la concentración espermática; aunque se observó una ligera tendencia de relación entre los testículos histológicamente funcionales con aquellas concentraciones $> 500 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Esto posiblemente sea debido a que el promedio de tejido funcional de los casos evaluados con esa concentración fue mayor, al compararse con los lavados epididimarios que presentaron concentraciones menores (Tabla 1).

Por otro lado, no se encontró diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los testículos de cada par (uno o dos), con respecto a los hallazgos histopatológicos y la concentración espermática epididimaria. La concentración obtenida fue de $5,32 \times 10^8$ espermatozoides/mL.

En la Tabla 2, se presentan las medidas de circunferencia escrotal, largo, ancho antero-posterior y peso testicular; así como el largo, ancho (eje mayor) y peso de la cola epididimaria de las piezas recolectadas. Las medidas observadas se corresponden con los promedio reportados por otros autores (Chacón *et al.*, 2002; Sudheer, 2000), para machos cebuínos. Tabla 2.

Evaluación de la morfología espermática epididimaria

Los resultados obtenidos en la evaluación de la morfología espermática epididimaria en cada protocolo de temperatura fue de 42,76% y 39,79%

Tabla 1. Porcentaje de tejido funcional para cada rango de concentración espermática

Concentración espermática	n	Funcionalidad (%)
0 – 500×10^6	52	60,12
$> 500 \times 10^6$	38	71,53

Tabla 2. Características morfométricas de testículos y colas epididimarias

Variable	Media	EE
Circunferencia Escrotal (cm)	31,80	0,47
<i>Medidas testiculares:</i>		
Ancho (cm)	5,56	0,11
Largo (cm)	11,36	0,22
Peso (g)	267,12	12,03
<i>Medidas de la cola epididimaria:</i>		
Ancho (cm)	1,58	0,07
Largo (cm)	1,92	0,06
Peso (g)	30,06	1,57

EE: Error estándar de la media

para los protocolos 1 y 2, respectivamente, no habiendo diferencias significativas ($P < 0,05$). En las Tablas 3 y 4, se observan los resultados obtenidos en la evaluación de las atipias primarias y secundarias de espermatozoides epididimarios en cada protocolo de temperatura, respectivamente.

En la Tabla 5, se comparan los resultados obtenidos en la evaluación de atipias primarias y secundarias de espermatozoides epididimarios en cada protocolo de temperatura.

La calidad de los espermatozoides epididimarios no varió al comparar los protocolos 1 y 2 entre sí (Tablas 3, 4 y 5). No hubo diferencias significativas atribuibles al efecto temperatura del instrumento de transporte sobre la calidad de los espermatozoides epididimarios, con la excepción de cuatro variables

relacionadas con las atipias espermáticas encontradas (cabezas piriformes, enrollamiento de la pieza media, cabezas amorfas y flagelos fracturados), que siempre fueron mayores ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente) en P1.

La concentración espermática evidenció una variación individual que pudiera ser debida a la variabilidad entre toros de matadero, la variabilidad entre testículos y los efectos del método de recolección.

Por otra parte, es importante acotar que en este estudio no se pudieron comparar los pares de testículos entre sí, debido al descarte que se hizo de algunos de ellos por anomalías histopatológicas, lo que implicó que algunos testículos quedaran sin pareja.

Los resultados obtenidos en este estudio no son comparables con los presentados por otros autores. Por ejemplo, Amann y Schanbacher (1983) reportaron para toros *Bos taurus* y en mediciones hechas *in vivo*, un promedio de 32×10^9 espermatozoides/mL, concentración superior a la encontrada en este estudio, con toros cebuínos para matadero y en análisis *postmortem*. La diferencia pudiera atribuirse, en primer lugar, a la técnica de recolección de lavado por flujo retrógrado en este estudio, y en segundo lugar, a que en los análisis *postmortem* la medición de la concentración espermática epididimaria es afectada por un efecto de reabsorción por parte del epidídimo, al momento de la muerte del macho (Amann y Almquist,

Tabla 3. Medias de las atipias primarias de espermatozoides epididimarios para protocolos 1 y 2

Variable	Protocolo		EE	Probabilidad
	1	2		
Atipias Primarias (%)				
Flexión pieza media	1,2	2,19	0,82	NS
Espermat. microcéfalos	0,24	0,5	0,25	NS
Espermat. macrocéfalos	0	0,91	0,11	NS
Cabezas piriformes	0,82	0,12	0,32	$< 0,05$
Cabezas estrechas	0	0	0	0
Defecto pieza media	0,39	0,24	0,26	NS
Gota proximal	0,61	0,43	0,37	NS
Inserción abaxial	0,59	0,65	0,36	NS
Enrollamiento de pieza media	1,42	0,21	0,40	$< 0,01$
Cabezas dobles	0	0,54	0,27	$= 0,05$
Pieza media doble	0	0	0	0
Flagelo doble	0	0	0	0
Cabezas amorfas	1,47	0,3	0,57	$< 0,05$
Enrollamiento del flagelo sobre la pieza media	0,62	0,67	0,44	NS
Total	7,04	6	1,13	NS

EE: Error estándar de la media; NS: no significativo

Tabla 4. Comparación de medias de las atipias espermatozoides epididimarios secundarias entre protocolos 1 y 2

Variable	Protocolo		EE	Probabilidad
	1	2		
Atipias Secundarias (%)				
Gota distal	14,95	14,96	0,99	NS
Enroll. distal del flagelo	3,81	7,17	1,65	= 0,05
Flexión del flagelo	15,2	17	3,44	NS
Sin acrosoma	0	0,13	0,17	NS
Cabezas desprendidas	5,69	9,22	1,93	NS*
Flagelos fracturados	11,08	5,7	1,61	< 0,01
Total	50,76	54,21	3,02	NS

EE: Error estándar de la media; NS: no significativo; NS*: no significativo pero con tendencia marcada

Tabla 5. Total de Atipias espermáticas epididimarias entre protocolos 1 y 2

Variable	Protocolo		EE	Probabilidad
	1	2		
Atipias Primarias (%)	7,04	6	NS	1,13
Atipias Secundarias (%)	50,76	54,21	NS	3,02
Total de Atipias (%)	57,22	60,2	NS	3,25

EE: Error estándar de la media; NS: no significativo

1962; McEntee, 1990). Ello podría justificar la baja concentración encontrada en el presente trabajo.

La cifra promedio de espermatozoides morfológicamente normales recolectados de la cola del epidídimo fue similar para ambos protocolos. En este sentido, Chenoweth (1997) reportó 70% de normalidad para espermatozoides presentes en el semen de toros, recolectado por métodos convencionales. Esta diferencia pudiera deberse a que la etapa de maduración espermática no se ha completado en todos los espermatozoides de la cola del epidídimo (Briz *et al.*, 1996).

El porcentaje promedio total para las atipias espermáticas primarias no fue diferente para los dos protocolos según se observa en la Tabla 4. Sin embargo, hubo diferencias significativas para tres de las catorce atipias estudiadas: cabezas piriformes ($P < 0,05$), enrollamiento de la pieza media ($P < 0,01$) y cabezas amorfas ($P < 0,05$); y el porcentaje de esas atipias siempre fue mayor en P1. Este estudio no fue diseñado para evaluar estas diferencias, por lo que se considera un hallazgo fortuito de la investigación, y no se considera su discusión. Se sugiere diseñar otra investigación para estudiar dicho hallazgo.

El porcentaje promedio total para las atipias espermáticas secundarias no fue diferente para los dos

protocolos, según se observa en la Tabla 5. Sólo hubo diferencia significativa para dos de las seis atipias secundarias estudiadas, y fue el caso de los flagelos fracturados ($P < 0,01$) y del enrollamiento distal del flagelo ($P < 0,05$). Este resultado es coincidente con los encontrados por Vogler *et al.* (1993), por lo que aparentemente el transporte a 35°C, de alguna manera propicia la ocurrencia de estas atipias.

No hubo diferencias significativas entre el total de atipias espermáticas, primarias y secundarias, entre los protocolos P1 y P2.

CONCLUSIONES

Los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo de toros *postmortem* mostraron sobrevivencia, aunque tienen menor calidad que los del semen bovino recolectados por métodos convencionales; ello se evidenció desde el mismo momento de su recolección, cuando se observó movilidad individual del 17,46% en P1 y del 8,95% en P2, movilidad que aumentó a 34,26% y 26,8% en P1 y P2, respectivamente, transcurrida una hora después de la recolección; sin embargo, esta variable es ampliamente discutida en otra publicación (Albers y Barrios, 2006).

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 calidad de los espermatozoides recolectados de la cola del epidídimo no fue afectada por la temperatura del instrumento de transporte.

REFERENCIAS

- Albers, M.I.; Barrios, D.R. 2006. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Trop.*, 24:267-280.
- Amann, R.P.; Almquist, J.O. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VI. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves: Aspects of epididymal physiology. *J. Reprod. Fertil.*, 3:260-268.
- Amann, R.P.; Schanbacher, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.*, 57:380-403.
- Axnér, E.; Linde-Forsberg, C.; Einarsson, S. 1999. Morfology and motility of spermatozoa from different regions of epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, 52:973-979.
- Bermúdez, V. 2002. Patología de la reproducción en el semental bovino de doble propósito. En: *Avances en la Ganadería Bovina de Doble Propósito*. González-Stagnaro, Soto Belloso y Ramírez Iglesia, eds. Ediciones Astro Data. Maracaibo, Venezuela, pp. 528-546.
- Briz, M.; Bonet, S.; Pinart, B.; Camps, R. 1996. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. *Anim. Reprod. Sci.*, 43:221-239.
- Chacón, J.; Pérez, E.; Rodríguez-Martínez, H. 2002. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. *Theriogenology*, 58:41-50.
- Chenoweth, P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: *Youngquist: Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders, First Ed. 217 p.
- Chung, J. 1997. Effects of sperm treatments on fertilization and *in vitro* development of bovine follicular oocytes. *Korean J. Emb. Trans.*, 12:189-194.
- Garde, J.; Perez, S.; Aguado, M.; Ayllon, E.; Garrido, D.; Montoro, V. 1995. Live birth of hybrid (O. musimon x O. aries) lambs following intrauterine insemination in domestic sheep with muflon semen obtained 40 hours post mortem. *Theriogenology*, 43:1-372.
- Gutierrez, R., Hernández, P., Fernández, R., Cruz, G. 2004. Congelación de espermatozoides obtenidos de colas de epidídimos de bovinos. *Rev. Salud Anim.*, 26:192-196.
- Hewitt, D.; Leahy, R.; Sheldon, I.; England, G. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 67:1-2, 101-111.
- McEntee, K. 1990. Reproductive Pathology of Domestic Mammals. Academic Press Inc., San Diego, California, 401 p.
- Mortimer, S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, 3:403-439.
- 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. *Reprod. Cambridge*, 122:463-467.
- Ott, L. 1977. Multiple Comparisons. En: *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*. Duxbury Press, pp. 378-407.
- Reyes-Moreno, C.; Gagnon, A.; Sullivan, R.; Sirard, M. 2000. Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J. Androl.*, 21:876-886.
- 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.*, 66:159-166.
- Songsasen, N.; Tong, J.; Leibo, S. 1998. Birth of live mice derived by *in vitro* fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *J. Exp. Zool.*, 280:189-196 (Abstr.).
- Sudheer, S. 2000. Relationship between testicular size and seminal attributes in crossbred bulls. *Indian J. Anim. Res.*, 34:159-160.
- Vogler, C.; Bame, J.; Dejarnett, J.; McGilliard, M.; Saacke, R. 1993. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology*, 40:1207-1219.
- Zomborszky, Z.; Zubor, T.; Toth, J.; Horn P. 1999. Sperm collection from shot Red Deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilization of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta Vet. Hung.*, 47:263-270 (Abstr.).