



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



**VALORACIÓN ESPERMÁTICA POST-MORTEM OBTENIDA DE EPIDÍDIMO
DE CARNERO Y VENADO COLA BLANCA**

Por:

JIMENA MUNGUÍA VELAZQUÉZ

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias**

Soledad de Graciano Sánchez, S. L. P.

Diciembre de 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



VALORACIÓN ESPERMÁTICA POST-MORTEM OBTENIDA DE EPIDÍDIMO
DE CARNERO Y VENADO COLA BLANCA

Por:

JIMENA MUNGUÍA VELAZQUÉZ

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

Asesores:

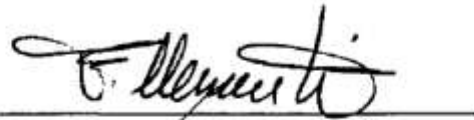
Dr. Fernando Clemente Sánchez
Dr. César Cortez Romero
Dr. Marco Antonio Rivas Jacobo
Dra. Camelia Alejandra Herrera Corredor

Soledad de Graciano Sánchez, S. L. P.

Diciembre de 2011

El trabajo titulado "Valoración Espermiática Post-Mortem Obtenida de Epidídimo de Carnero y Venado Cola Blanca", fue realizado por: Jimena Munguía Velázquez como requisito parcial para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Agropecuarias en el área de Producción de Pequeños Rumiantes, fue revisado y aprobado por el suscrito comité de tesis:

Dr. Fernando Clemente Sánchez
Asesor Principal



Dr. César Cortez Romero
Asesor



Dr. Marco Antonio Rivas Jacobo
Asesor



Dra. Camelia Alejandra Herrera Corredor
Asesor



Ejido Palma de la Cruz, municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S. L. P. a los 6 días del mes de diciembre de 2011.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mi familia que me acompaño durante esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, al Colegio de Posgraduados y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por proporcionarme los medios y recursos para la elaboración de la presente tesis.

A mi tutor Dr. Fernando Clemente Sánchez, por el apoyo.

A mis asesores: Dr. César Cortez Romero, que me instruyó y M. en C. Bertha Margarita Andrade, que me ofreció su apoyo incondicional.

A mis maestros, que me instruyeron; al M. en C. Felipe Morón, que me apoyó en la gestión para obtener recursos y espacios para realizar experimentos.

A los médicos: encargados del rastro municipal de Fresnillo, Zacatecas, México; al Director del Centro de Selección y Reproducción Caprina, Ing. José Alfonso Somohano Olvera y al encargado de la UMA Rancho Antrialgo, en el estado de Aguascalientes, C. P. Jaime Díaz Torre.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general.....	2
...Objetivos específicos.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Endocrinología de la Producción de Espermatozoides.....	4
Espermatogénesis.....	4
...Espermiogénesis.....	5
Transporte de los Espermatozoides.....	7
Secreciones de las Glándulas Sexuales Accesorias (GSA).....	8
Características de los Espermatozoides de la Cola del Epidídimo.....	8
...Conservación de Espermatozoides.....	11
Pérdida de los Osmolitos de Carga durante la Regulación del Volumen.....	14
Permeabilidad de la Membrana del Espermatozoide.....	15
Dilución de los Espermatozoides de la Cola del Epidídimo.....	16
Permeabilidad de los Espermatozoides a Solutos de Bajo Peso Molecular.....	17

Antecedentes de la Recuperación de Espermatozoides Provenientes de la Cola del Epidídimo <i>Postmortem</i>	17
Métodos para colectar el semen.....	18
Vagina artificial (VA).....	18
Electro-Eyaculador.....	19
Masaje Rectal.....	19
Contención Química.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Experimento I.....	21
Obtención de Muestras.....	21
Preparación de Muestras.....	21
Tratamientos.....	22
Variables de respuesta.....	22
Análisis estadístico.....	22
Experimento II.....	22
Obtención de la muestra.....	23
Preparación de la muestra.....	23
Tratamientos.....	24
Variables de respuesta.....	24
Análisis estadísticos.....	24
Experimento III.....	24
Obtención de los eyaculados.....	25
Contención química y Obtención de la muestra.....	25
Variables de respuesta.....	25
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Experimento I.....	27
Experimento II.....	30
Experimento III.....	31

CONCLUSIONES..... 35
LITERATURA CITADA..... 36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	página
1	Concentraciones espermáticas de cada repetición, evaluadas en el momento del lavado de los epidídimos <i>post-mortem</i> de carnero.....	28
2	Movilidad masal y concentraciones de espermatozoides obtenidos del lavado de epidídimos <i>post-mortem</i> de venado.....	31
3	Movilidad masal de espermatozoides de venado obtenidos por electroeyaculación.....	32
4	Concentración espermática de eyaculados de venado obtenidos por electroeyaculación.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Las etapas de la espermatogénesis y espermiogénesis.....	6
2	Secuencia de cambios fisiológicos del espermatozoide para fertilizar el ovocito.....	10
3	Comportamiento de la movilidad masal a diferentes tiempos (0, 6, 12 y 24 h) de refrigeración (5°C) en espermatozoides provenientes del lavado de epidídimos <i>post-mortem</i>	29

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue desarrollar protocolos específicos para la conservación de espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo de animales salvajes sacrificados, a fin de que puedan ser empleados en programas de conservación o mejoramiento genético. Se evaluaron cuatro tiempos de enfriamiento. en espermatozoides colectados de epidídimos de carneros sacrificados en el rastro municipal de Fresnillo, Zacatecas, México, durante junio y julio del 2011. De igual manera, se colectaron espermatozoides de dos pares de testículos *post-mortem* de venado cola blanca del producto del aprovechamiento cinegético 2011 en la UMA Rancho Antrialgo, en el estado de Aguascalientes. También se evaluaron 10 eyaculados de venado cola-blanca del laboratorio de la UMA “Módulo de Producción de Venado la Huerta” del Colegio de Postgraduados, Campus SLP. Los diez pares testiculares de carneros se transportaron al laboratorio en menos de 2 horas, donde los epidídimos fueron lavados con Triladyl® adicionándoles secreción de glándulas sexuales accesorias (SGSA). Como resultados del tiempo de refrigeración a 5°C sobre la movilidad masal de los epidídimos de carnero, se obtuvo una media de 83.5, 82.0, 80.5 y 78.1% para los tratamientos 0, 6, 12 y 24 h, respectivamente; la movilidad masal mostró una disminución; su efecto entre tratamientos no fue significativo ($P=0.67$). Por otra parte, las dos muestras de venado cola blanca fueron evaluadas en el momento del lavado de los epidídimos en refrigeración a -5°C con Biladyl® (tiempo 0) con movilidad masal de 50 y 60%, que se realizó en un lapso no mayor a 6 horas. La media de la concentración espermática de los epidídimos *post-mortem* de venado fue de 827.5×10^6 espermatozoides mL^{-1} . En el caso de los eyaculados de venado cola-blanca, la media en movilidad masal fue $91.8\% \pm 5.59$ y la media de las concentraciones espermáticas fue de $4,453.80 \times 10^6 \pm 1,714.15 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} . En conclusión, los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo de carneros pueden ser prospectos para la inseminación artificial, debido a que no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos probados. En las muestras obtenidas de la cola del epidídimo de venado cola blanca los resultados fueron bajos en cuanto a movilidad masal y concentración de espermatozoides. Los resultados obtenidos de los eyaculados de venado cola blanca los ubica como de buena calidad por lo que es recomendable para su conservación y uso posterior en inseminación artificial.

SUMMARY

The main goal of this study was to develop specific protocols for sperm preservation from wildlife epididymal spermatozoa, is essential for the establishment of genetic resource banks. Therefore, the present study was to evaluate four cooling times. Ram epididymides were collected in Fresnillo, Zacatecas, México, in slaughterhouse, during June and July 2011. Similarly, white-tailed deer testes were recovered from two mature male which were hunted in the nature hábitat at the “Rancho Antrialgo” UMA in the state of Aguascalientes (2011). Also white-tailed ten ejaculates evaluated from the laboratory of the UMA “Deer Production Module la Huerta” of the Colegio of Postgraduados, Campus San Luis Potosi. Ten pairs of ram testicular were transported to the laboratory withing 2 hours, epididymides were washed with Triladyl[®] and accessory sex glands secretion (ASGS) to 5°C. Masal motility average was 83.5, 82.0, 80.5 and 78.1% for 0, 6, 12 and 24 h in refrigeration, respectively; although the masal mobility showed a decrease, the effect of treatments was not significant (P=0.67). Moreover, the two of wite-tailed deer epididymides were tested only at the washing time with Biladyl[®] on refrigeration at -5°C (time 0), when the epididymides were transported around 6 hours, the masal motility showed 50 and 60%. Sperm concentration average of deer epididymides was 827.5×10^6 sper/mL. According to white-tailed deer ejaculates, the masal motility average was $91.8 \pm 5.59\%$ and sperm, concentration mean was $4453.80 \times 10^6 \pm 1714.15 \times 10^6$ sperm/mL. In conclusion, the ram epididymal sperm could be prospected for artificial insemination because there was no significant difference between treatments. Epididymis-washing procedure from white tailed deer showed lower results about to masal motility and sperm concentration. The results obtained from the deer ejaculates had good quality so we suggest that the deer ejaculates can preserve it and use it in artificial insemination.

INTRODUCCION

En la actualidad diversas especies de mamíferos, están en peligro de extinción, lo que ha propiciado la aplicación y búsqueda de técnicas para recuperar y conservar las especies. Gran cantidad de animales silvestres son cazados anualmente en todo el mundo (Martínez-Pastor *et al.*, 2005c). En México, en 2001 se creó al amparo de la Ley General de Vida Silvestre el instrumento para la implementación de las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), en las cuales se permite el aprovechamiento extractivo de las especies silvestres a través de la cinegética, como una opción. Bajo este fundamento, nace el interés de conservar los genotipos originales de especies silvestres como el venado cola-blanca, venado bura, borrego cimarrón y el berrendo, entre otros.

Para ello se han estado empleando especies domésticas que sirvan como modelos experimentales, con el fin de poder identificar procedimientos que en su momento puedan ser acoplados a especies silvestres como el caso del venado cola-blanca. En este sentido, estudios para la obtención y conservación de espermatozoides han resultado ser de importancia para refrigerar espermatozoides obtenidos a partir del lavado de epidídimos, empleando técnicas de vanguardia en la reproducción asistida, como el caso de la inseminación artificial.

Algunas de las ventajas del uso de inseminación artificial son: permitir la selección y uso de animales genéticamente superiores por su conformación y peso corporal; el uso de sementales y vientres superiores; disminución de enfermedades por transmisión sexual; manejo de la temporada de reproducción; y la detección temprana de machos infértiles (Hafez 2002). En la actualidad y en específico para México, el uso de estas técnicas en el manejo de las UMAs se justifica debido a que la actividad cinegética en México representó para el 2005 una derrama económica superior a los \$900 millones de pesos, tan solo en los estados de Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila (Clemente *et al.*, 2008), en Estados Unidos la temporada de venado es una industria forestal, que contribuye a la economía con 3 billones de dólares anuales, en el estado de Texas se expiden 1,100 licencias de caza anuales, de acuerdo al estudio realizado en Texas A&M study (Kjelland *et al.*, 2011).

El conocimiento de técnicas de reproducción está bien documentado, por ejemplo, Songsasen *et al.* (1998) realizó fertilización *in vitro* a temperatura ambiente con espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo de ratones 24 h post-mortem. An *et al.* (1999) recuperaron espermatozoides viables de ratón, después de refrigerar los testículos durante 7 días post-mortem, reportando éxito en la fertilización *in vitro*. Yu y Leibo (2002) demostraron que el porcentaje de movilidad, integridad de la membrana y la integridad del acrosoma de los espermatozoides no presentan variación significativa después de 8 días en refrigeración a 4°C. Martínez *et al.* (2005a) observaron que la movilidad de los espermatozoides es menor en el momento del lavado, está aumenta antes de ser congelados ($84.5\% \pm 1.5\%$) y en el momento del deshiele disminuye ($67\% \pm 1.8\%$). Por otra parte, el daño acrosomal aumenta significativamente de $3.2\% \pm 0.7\%$ a $8.1 \pm 1.2\%$. Al ser evaluados los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo de venado rojo y venado de Roe y conservados a 5°C, se observó que la motilidad es el parámetro de calidad que más se afecta (Kaabi *et al.*, 2003).

En la técnica de recolección, hay que considerar que al recuperar los testículos será necesario refrigerarlos para ser transportados al laboratorio donde se extraerán, procesarán y evaluarán los espermatozoides. Al respecto, Yu y Leibo (2002); Martínez *et al.* (2005b) obtuvieron resultados contrastantes por efecto del tiempo en que permanecen refrigerados los testículos, por lo que resulta importante realizar estudios para comprobar la hipótesis de que los espermatozoides de la cola del epidídimo mejoran su motilidad cuando se emplean las secreciones de las glándulas sexuales accesorias junto con el diluyente en el proceso de refrigeración.

Objetivo general: Elaborar un protocolo viable que garantice la conservación de espermatozoides de carnero post-mortem que pueda ser empleado en la conservación de espermatozoides de venados cola blanca sacrificados en la temporada de caza.

Objetivos específicos:

1. Determinar la relación del lavado de epidídimos *post-mortem* de carnero con secreciones de las glándulas sexuales accesorias (SGSA) y Triladyl® en la movilidad masal y concentración espermática.
2. Determinar el efecto y comportamiento del tiempo de refrigeración (0, 6, 12 y 24 h) de espermatozoides obtenidos del lavado de epidídimos de carneros domésticos *post-mortem* sobre la variable de respuesta movilidad masal.
3. Determinar la movilidad masal y la concentración espermática de la cola del epidídimo *post-mortem* y por electro-eyaculación de venado cola blanca.

REVISION DE LITERATURA.

Endocrinología de la Producción de Espermatozoides

Endocrinológicamente la producción de espermatozoides requiere secreciones de: hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo; hormona folículoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) del lóbulo anterior de la glándula pituitaria y testosterona y estrógenos de las gónadas. Las descargas de GnRH del hipotálamo en los machos son intermitentes. Las pulsaciones de GnRH suceden en pocos minutos, causando descargas de LH, las cuales duran de 10 a 20 minutos y suceden de 4 a 8 veces cada 24 h. La concentración de FSH son bajas, aunque sus pulsaciones tienen la misma duración que las de LH, estas se ven afectadas por la secreción constante de inhibina proveniente de los testículos. La hormona LH actúa en los receptores de las células de Leydig de los testículos, dando como resultado la producción de progesterona, la cual a través de la síntesis de esteroides se produce testosterona. Cuando ocurre un episodio de LH, las células de Leydig sintetizan y secretan testosterona en 30 minutos (Neill *et al.*, 2006).

Espermatogénesis

La formación de los espermatozoides, involucran una serie compleja y bien regulada de transformaciones celulares. En los mamíferos, los espermatozoides alcanzan su maduración completa siguiendo un patrón general que se ha dividido artificialmente en dos etapas, como se muestra en la figura 1, la espermatogénesis consiste fundamentalmente de una serie de cambios citobioquímicos que inician con el desarrollo de las espermatogonias, a partir de las células germinales primordiales que migran hacia los testículos durante la primera parte de la embriogénesis. Cuando el animal alcanza la madurez sexual, la espermatogonia empieza a proliferar rápidamente, generando progeñe que retiene la capacidad de continuar dividiéndose indefinidamente (como células madres de espermatogonias) y otra progeñe (espermatogonias en maduración) que después de un número limitado de ciclos de división normal inicia la meiosis hacia el espermatocono primario. Esto continúa a través de la división meiótica hasta espermatocono secundario. Al ser completada la división meiótica II, los espermatoconos producen espermátidas haploides (Bruce *et al.*, 1994). Durante la división

meiótica se consuma la reducción a la mitad del número de cromosomas presentes en las células somáticas, diploides, para concluir como células germinales haploides (espermátidas). Otro de los cambios que se dan durante la meiosis, trata de la modificación completa de la cromatina, la cual en la células somáticas está básicamente constituida por ácido desoxirribonucleico (ADN), un poco de ácido ribonucleico (ARN), ciertas proteínas de carácter básico llamadas histonas, y algunas otras proteínas de carácter ácido llamadas proteínas cromatínicas no histónicas (Coelingh *et al.*, 1972 y Kistler *et al.*, 1973).

Espermiogénesis

Una vez culminada la espermatogénesis, las espermátidas resultantes sufren una serie de cambios morfológicos progresivos que resultan en la formación del espermatozoide. En este proceso la cromatina de la célula germinal lleva a cabo una extensa reorganización y condensación, Además, durante la espermiogénesis se da la formación de la cola y el desarrollo del casquete acrosómico. Los cambios antes mencionados hacen a la cromatina metabólicamente inactiva, lo que indica que ya no hay división celular y que el espermatozoide resultante es incapaz de sintetizar ADN o ARN (Bruce *et al.*, 1994 y Hafez, 2002).

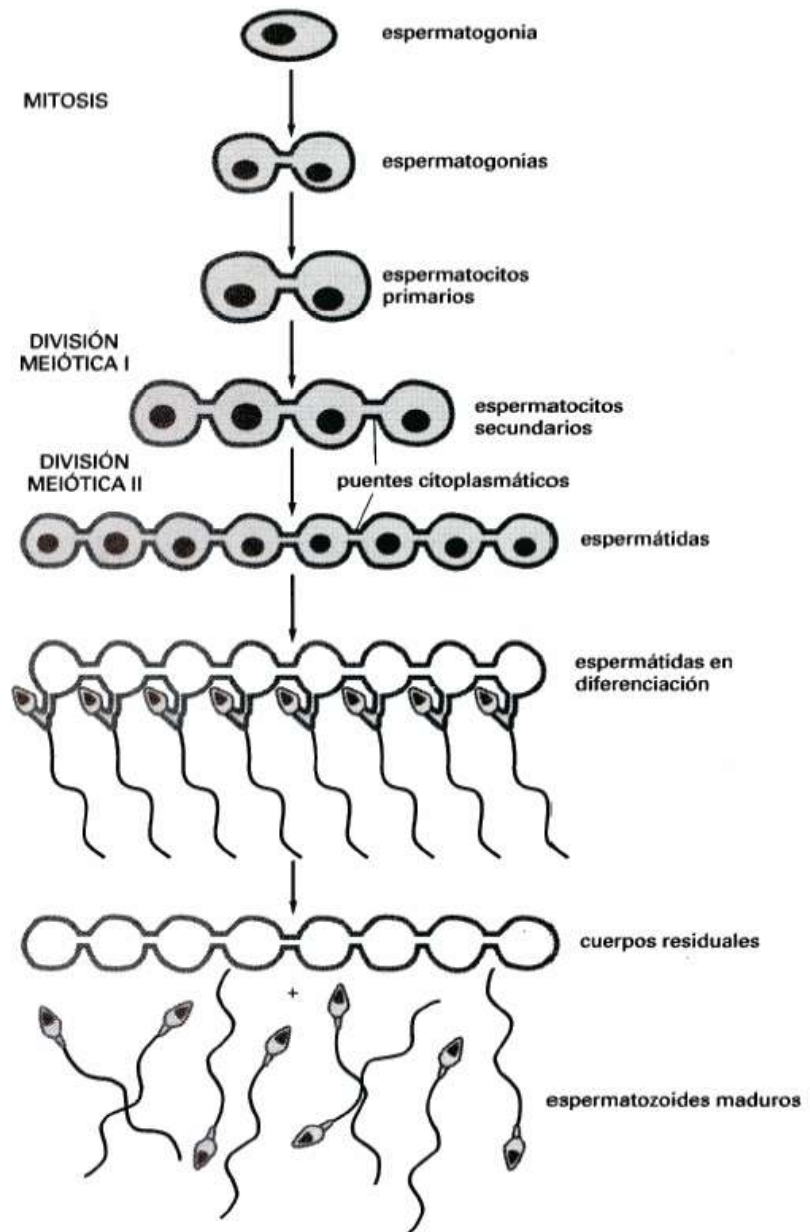


Figura 1. Las etapas de la espermatogénesis y espermiogénesis (Adaptado de Bruce*et al.*, 1994).

Transporte de los Espermatozoides

En lo que respecta al transporte de los espermatozoides, en un principio estos son incapaces de moverse, de allí que el transporte inicial a la *rete testis* depende del fluido secretado por las células de Sertoli. Una vez recorrida la *rete de testis*, el transporte de los espermatozoides a través de los conductos eferentes, cabeza y cuerpo del epidídimo es mediado por el epitelio del epidídimo, gracias a las células ciliadas, más la presión hidrostática interna y las contracciones peristálticas de la musculatura lisa que en ellos se localizan. El paso de los espermatozoides a través de los conductos eferentes y el epidídimo proporciona a estos, la movilidad progresiva lineal (Johnson y Everitt, 1980 y Chenoweth, 1997). La principal función del epidídimo de los mamíferos es propiciar un micro desarrollo que ayuda a la transformación de espermatozoides maduros y fértiles mediante la testosterona que ejerce una influencia directa en la maduración espermática. En el epidídimo los receptores intracelulares captan andrógenos y la enzima 5 α -reductasa convierte la testosterona en 5 α -dihidrotestosterona. La maduración espermática en el epidídimo depende de secreciones epiteliales, transporte de sodio y potasio, andrógenos y temperatura escrotal (Neill *et al.*, 2006), los espermatozoides se depositen y almacenen en la cola del epidídimo, donde se lleva a cabo la reabsorción e intercambio de fluidos (King, 1994; Barrios, 2002), para su posterior ingreso en regiones donde las secreciones de las glándulas accesorias se incorporan para formar el eyaculado (Chenoweth, 1997; Hernández-Perez y Ballesteros 1998; Roy, 2004; Bruce *et al.*,1994). La maduración de los espermatozoides en epidídimo, es imprescindible para la capacitación de los mismos. Al inseminar conejas con espermatozoides provenientes de diversas regiones del epidídimo, se encontró que la fecundación no procede cuando los espermatozoides provienen de la cabeza y cuerpo proximal del epidídimo. Los porcentajes de fecundación de los espermatozoides procedentes del cuerpo distal, cola proximal, cola distal y eyaculado fueron de 57, 74, 95 y 95% respectivamente (Alvariño, 1993), lo que indica que solo los espermatozoides del eyaculado y de la cola del epidídimo tienen un porcentaje de fecundación mayor para la fertilización del ovocito.

Secreciones de las Glándulas Sexuales Accesorias (GSA)

Las glándulas sexuales accesorias (GSA) son: próstata, vesículas seminales y bulbouretrales. Son órganos del sistema reproductivo, las cuales responden a los andrógenos y están íntimamente relacionados con las gónadas; ellas proporcionan los componentes del plasma seminal, y en espermatozoides con fertilidad deficiente los mejoran, aun que, La ausencia de las glándulas sexuales accesorias no provocan infertilidad en los machos. Con las técnicas de reproducción asistida se logran fertilizaciones con espermatozoides que no han tenido contacto con el plasma seminal. El plasma seminal contiene una alta concentración de potasio, zinc, ácido cítrico, fructosa, fosforilcolina, espermina, aminoácidos libres, prostaglandinas y enzimas (Neill *et al.*, 2006). Las vesículas seminales aportan al plasma seminal: proteínas las que son importantes para la motilidad espermática y agentes antioxidantes que posiblemente protejan al espermatozoide (Al-Hajj *et al.*, 2004).

Características de los Espermatozoides de la Cola del Epidídimo

Los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo y del eyaculado son diferentes entre sí en diversos aspectos; de acuerdo con la experiencia de Martínez-Pastor *et al.*, (2005a) los espermatozoides provenientes de epidídimo son generalmente más lentos, frecuentemente presentan debilidad en el movimiento de la cola, con un desplazamiento lento o nulo y algunas veces no se detecta la motilidad con análisis del semen asistido por medio de computación (CASA-Computer Assisted Analysis). El calentamiento tiene un efecto positivo sobre la constante de motilidad, Carr *et al.*, (1985) reporta que tienen un pH bajo; Cooper (1998); Noiles *et al.* (1995) detectan la presión del fluido hiper-osmótico, y Free *et al.* (1976) encontró que la tensión del oxígeno es baja.

Muchos estudios de espermatozoides del epidídimo de ratones reportan la osmolaridad de 286-290 a 300 mmol kg⁻¹ (Du *et al.*, 1994; Noiles *et al.*, 1995, 1997; Willoughby *et al.*, 1996; Agca *et al.*, 2002; Walters *et al.* 2005). la tonicidad del espermatozoide en el epidídimo, se establece después de la primera infiltración de solutos con lo cual se puede estimar la

permeabilidad de la membrana del espermatozoide. Cooper *et al.* (2006) sugiere que la tonicidad de los espermatozoides de la parte caudal del epidídimo en ratones, cierra la osmolaridad a los fluidos del epidídimo, aunque, en el tracto reproductor de la hembra sucede lo contrario. Los espermatozoides que se inflaman tienen problemas para regular su volumen debido a la pérdida de osmolitos, lo cual representa desventaja en la fertilización natural (Yeung *et al.*, 2004).

Varias secreciones del epidídimo (glicerofosfo-colina, glutamato, L-carnitina y mio-inositol) no provocan el aumento en el tamaño y permeabilidad del espermatozoide (Cooper *et al.*, 2004). Los espermatozoides del epidídimo isotónicos son impermeables a las secreciones (los canales están cerrados) y captan osmolitos y posiblemente es cuando ocurre el estrés hipertónico que involucra la sensibilidad de los canales de la membrana celular (Cooper y Yeung 2003).

La habilidad de los espermatozoides para regular el volumen, dentro del tracto reproductivo del macho, es una parte integral de su vida. En los testículos hasta la parte caudal del epidídimo aumenta la osmolaridad (Cooper *et al.*, 2003); en la parte distal del tracto reproductor masculino la osmolaridad es baja (Cooper y Barfield, 2006). Esto permite que la célula se inflamen para la regulación de volumen en descenso (RVD), el cual es un evento importante debido a que si el volumen ajustado es inadecuado, puede dar como resultado la infertilidad (Cooper *et al.*, 2003). El mecanismo de aumento y decremento del volumen en la célula es un proceso que involucra el flujo de entrada y de salida a través de la membrana y transporte de moléculas de bajo peso, agua y componentes solubles, los que contrarrestan los movimientos osmóticos del agua que se conducen por los cambios osmóticos extracelulares (Cooper *et al.*, 2006).

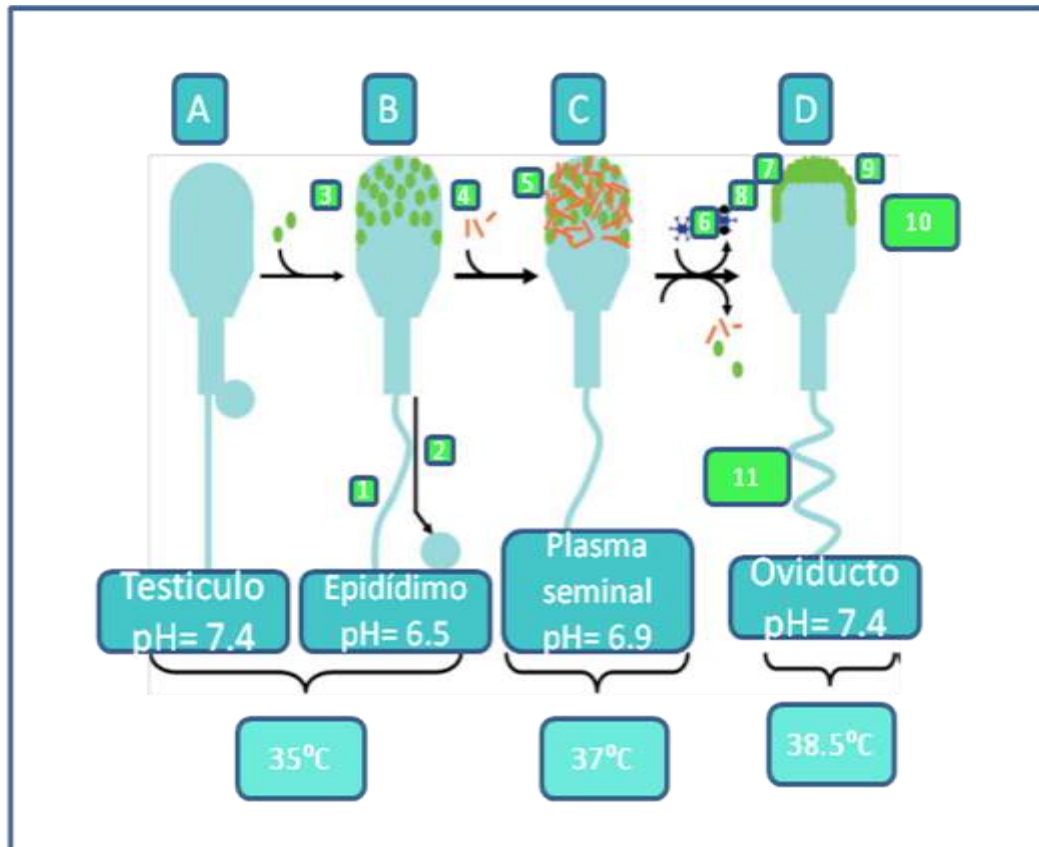


Figura 2. Secuencia de cambios fisiológicos del espermatozoide para fertilizar el ovocito.

(A) cuando el espermatozoide sale del testículo está morfológicamente completo, pero no tienen la capacidad de fertilizar al ovocito debido a que estos son inmóviles y presentan gota citoplasmática. (B) Espermatozoides del epidídimo (1) adquieren movilidad, (2) pierden la gota citoplasmática y (3) se lleva a cabo la última condensación de la cromatina. Los espermatozoides sufren varios cambios moleculares. El más importante es la absorción de proteínas (verde) que se lleva a cabo en la zona de unión del espermatozoide (4) y en la superficie se estabilización de los factores. (C) En la eyaculación, los espermatozoides se mezclan con el plasma seminal de las glándulas sexuales accesorias. Las glicoproteínas del plasma seminal (anaranjado) se adhieren a la superficie de los espermatozoides lo que le da estabilidad durante el transporte a través de la porción inferior del tracto genital femenino. Cuando los espermatozoides llegan al ismo del oviducto, donde se activa la capacitación, el mecanismo es desconocido, pero se cree que la migración de los espermatozoides hacia el

útero provoca la eliminación de los factores descapacitantes (anaranjado) los espermatozoides responden a las señales que derivan de la hembra (Holt y Fazeli , 2010). *In vitro*, esta respuesta se produce tras el lavado en gradiente de densidad (que excluye los factores descapacitantes procedentes del epidídimo y las secreciones de las glándulas sexuales accesorias de la superficie de los espermatozoides) y la incubación con bicarbonato y albúmina. El tratamiento provoca cambios en la membrana del espermatozoide: (6) el colesterol se oxida (negro) y es retirado de la superficie del espermatozoide por la albumina. (7) las proteínas del epidídimo (verdes) se aglutinan en la parte superior de la membrana de la cabeza del espermatozoide, (8) los lípidos luchan por tomar el mismo lugar (9) y los seminolípidos migran hacia la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide. La porción apical de la cabeza del espermatozoide esta acoplada a la membrana externa acrosómica (10), el área apical de la cabeza está ahora preparada para la fertilización, ya que contiene complejos de proteínas capaces de interactuar con la zona pelúcida (Tomado de Leahy y Gadella, 2011).

Conservación de Espermatozoides

Los espermatozoides fueron las primeras células que fueron criopreservadas en ranas, gallos, bovinos y humanos. El éxito del procedimiento en las tres últimas especies, fue por el descubrimiento del glicerol en 1949 (Holt, 2000). Este procedimiento se desarrollo casi empíricamente hace mas de 60 años, hoy en día se continúa empleando (Leibo y Bradley, 1999; Holt, 2000), esto no quiere decir que sea el óptimo, debido a que se sigue buscando que este método sea más funcional y práctico, con mayor sobrevivencia de los espermatozoides, aunque, con inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), los espermatozoides pueden fertilizar a los ovocitos aun con 100% de espermias muertos (Liebermann *et al.*, 2002).

El protocolo de criopreservacion consiste en un enfriamiento – lento/ deshiele - rápido. La congelación involucra la precipitación del agua que da como resultado la formación de hielo, el agua se separa y las sustancias del espermatozoide se disuelven debido a la formación de un gran número de cristales intracelulares, también se presentan cambios osmóticos en las células (Liebermann *et al.*, 2002).

Los espermatozoides de varias especies presentan diferente sensibilidad al enfriamiento. En la fase inicial de la congelación, los espermatozoides de los ratones presentan una disminución en la permeabilidad de la membrana (Devireddy et al., 1999; Devireddy et al., 2004), disminuyendo la viabilidad de los espermatozoides, causado por el tratamiento isotónico y pérdida de componentes intracelulares, estos daños son ocasionados por la deshidratación, rehidratación de las células (Holt & North 1984, De Leeuw et al. 1990, Drobnis et al. 1993) y la transición de la fase de los lípidos (Buhr et al., 1994). El glicerol modula la deshidratación e hidratación de la célula (Hammerstedt et al., 1990).

Durante la dilución y saturación del crioprotector, los espermatozoides sufren stress osmótico y toxico, lo cual tiene un efecto negativo en el material genético (Critser et al., 1988; Gilmore et al., 1997; Holt, 1997). Kjelland et al. (2011) en el ambiente biológico del diluyente para conservar las características del semen, se acumula metabolitos tóxicos, enzimas libres, o ambos, los cuales llegan al acrosoma, lo que puede acelerar la degeneración del espermatozoide sobrevivientes. En general, la cromatina en los espermatozoides de venado Cola- Blanca es estable durante el procedimiento del sexado de espermatozoides.

Los trisacárido rafinosa no penetran la célula, por tanto su función no está bien definida (Mazur et al., 2000), aunque Liebermann et al. (2002) observó que con el empleo de disacáridos tales como: sucrosa y trealosa, en la criopreservación de embriones humanos, disminuye la toxicidad de la yema de huevo y actúa como un buffer reduciendo el choque osmótico.

Los polímeros como el polivinilpirrolidona (PVP) y polietilen-glicol (PEG) pueden proteger las células del estrés que presentan durante la criopreservación. Suponen que los polímeros forman una viscosa red (matrix) que encapsula las células reduciendo la cristalización (Dumoulin et al., 1994; Kasai et al., 1990; Kuleshova et al., 2001).

Los espermatozoides son sensibles al oxígeno reactivo el cual se encuentra en forma de radicales libres, por tanto, se pueden incluir en el criopreservador agentes antioxidantes (Koshimoto *et al.*, 2000; Mazur *et al.*, 2000). Fernández-Santos *et al.* (2007) encuentra que al adicionar antioxidantes enzimáticos o la vitamina E y C para la criopreservación, aumenta la viabilidad espermática. La motilidad, integridad del acrosoma y el estado de la mitocondria del espermatozoide, mejoran en el momento del deshiele. La pérdida de la motilidad de los espermatozoides es un indicativo de la tasa de peroxidación de los lípidos (Alvarez *et al.*, 1987). La fluctuación de la temperatura provocan que las grasas polisaturadas y el colesterol se pierden (Maldjian *et al.* 2005, Chakrabarty *et al.* 2007). Los cambios en la permeabilidad de los espermatozoides afectan el intercambio superficial del agua, iones y extensores (Hagiwara *et al.* 2009, Oldenhof *et al.* 2010) dando como resultado una disminución en la habilidad de soportar el estrés. Sin embargo, las proteínas y los extensores, como la leche, albumina o yema de huevo, provén de una protección parcial en la superficie de la membrana del espermatozoide durante la criopreservación (Ricker *et al.*, 2006), previniendo la unión de las proteínas en el espermatozoide, lo que disminuye la sobrevivencia del espermatozoide (Bergeron *et al.*, 2004).

En la criopreservación los espermatozoides sufren alteraciones y necesitan ser capacitados (Watson, 1995; Maxwell y Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997), para poder efectuar la reacción acrosomal. Este proceso es diferente a la capacitación fisiológica (Leahy y Gadella, 2011). Green & Watson (2001) reportan que la fosforilación de tirosina y el intercambio de lípidos es menor en los espermatozoides de cerdo que se enfriaron a 5°C a los que fueron capacitados *in vitro*. De Leeuw *et al.* (1990) especula que al ser congelados los espermatozoides pierden colesterol y aumenta la permeabilidad de la membrana, por tanto no tienen éxito en la capacitación fisiológica.

En la membrana plasmática de los espermatozoides, en un medio capacitante y en la capacitación fisiológica, el colesterol sale del espermatozoide (ver figura 2) (Travis y Kopf, 2002; Witte & Schafer-Somi, 2007). Esta modificación es esencial para la fertilización (Parinaud *et al.* 2000), aun que incrementa la vulnerabilidad del espermatozoide (Van Gestel *et al.* 2005b). Al

congelar y deshiele los espermatozoides presentan modificaciones en los lípidos aumentando la fluidez de la membrana, parcial codificación de los fosfolípidos (Thomas et al., 2006) y pierde ácidos grasos polinsaturados y colesterol (Maldjian et al., 2005, Chakrabarty et al., 2007). Está bien documentado que los extensores protegen del daño ocasionado por el congelamiento y el deshiele a los espermatozoides (Watson 1981, Holt y North 1988). La mezcla de lípidos, incluso el colesterol (Moore et al., 2005), aparentemente son de los mejores aditivos para prevenir el daño, recientemente se emplea colesterol-Ciclodextrina (Shadan et al., 2004).

Pérdida de los Osmolitos de Carga durante la Regulación del Volumen

Los cambios de volumen se estudia en varias especies para comprender la infertilidad de los machos, el diseño de nuevos anticonceptivos y para mejorar los protocolos de criopreservación (Cooper y Barfield, 2006), cuando los espermatozoides sufren alteraciones en el volumen después de ser removidos del tracto reproductor, son por la adición de los agentes crioprotectores (CPA), y su efecto dependen de la relativa permeabilidad de la membrana al agua y CPA. La célula inicialmente encoge en un medio hipertónico y después se hincha por el glicerol y agua que entran a la célula; esto ocurre en espermatozoides de humanos y murine (Gao et al., 1995; Agca et al., 2002). Durante el proceso de congelación, aumenta la osmolaridad extracelular tendiendo a deshidratar la célula; esto se revierte durante el deshiele y se agrava aún más cuando la matriz extracelular remueve el CPA y agua, los cuales entra a la célula (Gao et al., 1997).

Es posible que el proceso de regulación del volumen provocada por el cambio de osmolaridad agota los osmolitos de la célula, por lo que, pierde su capacidad para mantener el tamaño de la célula durante la inseminación y conserve su capacidad fecundante. Por tanto, la eficiencia en la regulación del volumen podría ser la base para evaluar el daño a los espermatozoides, de los diferentes CPA (Songsasen y Leibo, 1997). Se puede mejorar la criopreservación, minimizando la adicción y remoción del volumen de CPA en los pasos secuenciales de la criopreservación (Gao et al., 1995; Phelps et al., 1990; Agca et al., 2002) y su ministración simultánea de CPA que no penetre la célula (Agca et al., 2002). Algunos autores recomiendan el uso de CPA con mayor permeabilidad que el agua, para evitar los cambios del

volumen, aunque se tiene que especificar entre las diferentes especies animales, por que presentan diferencia en la penetración del CPA (Agca *et al.*, 2002) y la tolerancia osmótica (Walters *et al.*, 2005). El conocimiento del potencial de permeabilidad de cada CPA puede optimizar el protocolo de criopreservación debido a que si hay una alta penetración de solutos (CPA) la célula podría hincharse, ocasionar RVD y por tanto la pérdida de osmolitos, lo que compromete la supervivencia de los espermatozoides (Cooper *et al.*, 2006).

Permeabilidad de la Membrana del Espermatozoide

Los componentes de bajo peso molecular, fueron los primeros en ser examinados en cuanto a permeabilidad de la membrana se refiere por Drevius (1971, 1972) en dicha medición de espermólisis y spermatocrito se tomaron los índices de inflamación en espermatozoides del epidídimo de bovinos. La osmolaridad del fluido epididimario fue (c. 353mmol/kg). Los crioprotectores cuando penetran la célula, inducen movimiento flagelar no lineal (Yeung *et al.* 2002).

Una parte importante en la criopreservación es el uso de extensores los que producen cambios de volumen y osmóticos en la célula, el cual si es excesivo puede ser perjudicial. El límite osmótico de tolerancia de los espermatozoides es bajo, el cual se puede medir por el coeficiente de permeabilidad al agua (Mazur *et al.*, 2008).

Los CPA causan inflamación de los espermatozoides debido a la pérdida de osmolitos, dando como resultado RVD. Lo que se considera como beneficio al emplear CPA en la criopreservación causan un cambio menor en el volumen de la célula y se estima que permite la carga de osmolitos en cantidades adecuadas. Los espermatozoides de ratones después de ser descongelados, podrían tener una pobre fertilidad debido a la deficiencia para regular el volumen de la célula (Cooper *et al.*, 2004).

Dilución de los Espermatozoides de la Cola del Epidídimo

La osmolaridad citoplasmática puede ser determinada cuando las células son bañadas con un medio, aunque no tengan una respuesta osmótica. Los espermatozoides de la cola del epidídimo, al ser expuestos a diferentes medios de transporte de los osmolitos, se pueden evaluar los daños de la célula, por inflamación y pérdida de la función para la regulación del volumen y el grado de la fluidez de la osmolaridad del agua. La inflamación de los espermatozoides es menor en presencia de quinina debido a que la osmolaridad extracelular crece, aunque al aumentar el volumen, la regulación de este se lleva a cabo de manera natural dependiendo del medio (Cooper & Barfield, 2006). Los valores bajos de osmolaridad de los espermatozoides del epidídimo reflejan su tonicidad *in Situ* (Cooper *et al.*, 2004).

La regulación del volumen del espermatozoide es con baja fuerza iónica y componentes extracelulares, que son los responsables del aumento de la osmolaridad, la influencia del medio se obtiene por la tonicidad intracelular.

La alteración en la fuerza iónica podría afectar la carga de la membrana alterando las bombas y canales de la membrana, modificando el flujo a través de la misma. Directa o indirectamente, estos cambios se modulan con el movimiento de los osmolitos. La fuerza iónica extracelular modula el efecto de inhibidores de los canales de potasio dependientes del voltaje (Knaus *et al.*, 1995), en varios estudios se ha demostrado que la fuerza de iones intracelulares inducen el flujo del agua alterando la actividad de regulación del volumen en los canales del anión (Sabirov *et al.*, 2000). La disminución en el tamaño del espermatozoide cuando se aplican altas concentraciones de quinina o sucrosa, indican una inhibición del aumento en la regulación del volumen (RVI) lo cual ocurre cuando los espermatozoides se deshidratan. La quinina puede prevenir parcialmente RVI en los espermatozoides de los porcinos. (Petrunkina *et al.*, 2005).

Permeabilidad de los Espermatozoides a Solutos de Bajo Peso Molecular

Algunos de los componentes de 6 carbonos o menos penetran lo suficiente para causar la inflamación del espermatozoide (Drevius 1971). El manitol y dulcitol tienen más penetración en la célula que otros compuestos del mismo peso molecular, lo que posiblemente permite el transporte de glucosa y fructosa al espermatozoide (Tsukaguchi *et al.*, 1998; Rigau *et al.*, 2002).

El descubrimiento del TRIS (hidroximetil aminometano), el cual tiene menor penetración que el glicerol (GLY) quedando implícito el hecho que la célula presenta menor inflamación que con el GLY, además que aumenta la posibilidad de tener más espermatozoides viables después de la descongelación, aunque podría aumentar inicialmente la reducción de la célula (Storey *et al.*, 1998).

Antecedentes de la Recuperación de Espermatozoides Provenientes de la Cola del Epidídimo *Postmortem*

En los años 30's, Walton (1930) obtuvo espermatozoides del conducto deferente de conejo, capaces de fecundar al ovocito, después de haber sido refrigerados a 15 y 10°C. En los 80's, espermatozoides viables fueron recuperados de un humano en estado vegetativo (Rothman, 1980) en los 90's se realizaron fertilizaciones *in Vitro* con espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo de cadáveres de ratones a 24 h *postmortem* a temperatura ambiente (Songsasen *et al.*, 1998). An *et al.* (1999) recuperaron espermatozoides viables de epidídimos de ratones refrigerados durante 7 días *postmortem* y lograron la transferencia de embriones por medio de la fertilización *in vitro*. Kishikawa *et al.* (1999) obtuvieron fetos normales de ratones, tras una ICSI al ovocito de espermatozoides inmóviles previamente recuperados 20 días *postmortem*, además reporta una variación en el porcentaje de viabilidad de un 65% en fresco a un 55% tras haberse refrigerado a 4°C durante 5 días *postmortem*. En este siglo Yu y Leibo (2002) refrigeraron a distintos tiempos (5, 18, 24, 40, 48, 120, 144, 168 y 192) a 4°C, testículos de perro obtenidos por orquiectomía, encontraron que los espermatozoides frescos extraídos de la cola del epidídimo con respecto a los refrigerados, no variaron en cuanto al

porcentaje de integridad del acrosoma, aunque la movilidad y la integridad de la membrana disminuyó significativamente, al ser sometidos en refrigeración a 4°C, debido al choque térmico. En contraste, la motilidad espermática se vio disminuida como resultado del aumento del tiempo en refrigeración a 4°C, sin afectar la viabilidad (Hishinuma *et al.*, 2003). Por otra parte, distintos trabajos en venado rojo y venado roe (Martínez-Pastor *et al.*, 2005c) y en venado rojo ibérico (Anel *et al.*, 2002), concluyen que la movilidad es el parámetro que más se ve afectado en la evaluación de los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo, conforme aumenta gradualmente el tiempo *postmortem*. Sin embargo, Soler y Garde (2003) reportan una motilidad mayor a 80% en espermatozoides de venado rojo que han permanecido entre 2 y 17 h *postmortem*.

Cuando los espermatozoides no se pueden coleccionar inmediatamente del epidídimo, Kaabi *et al.* (2003), recomiendan preservar los epidídimos a 5°C y procesar la muestra en las primeras 24 h después de muerto el animal, puesto que la capacidad fertilizante *in Vitro* de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de carneros a 0 y 24 h *postmortem*, es similar a la que presenta el eyaculado. Garde *et al.* (1994) reportan que la movilidad después de 2, 24 y 48 h en refrigeración es de un 87.1%, 82.4% y 75.9% respectivamente.

Métodos para coleccionar el semen

Vagina artificial (VA)

La obtención de semen en animales silvestres representa en sí misma una considerable dificultad. En animales domésticos se ha recurrido al entrenamiento de los machos para poder obtener semen de forma rutinaria mediante el empleo de «vagina artificial». Los carneros para poder eyacular en una VA requieren entrenamiento. La forma más sencilla es coleccionarlos utilizando como estímulo hembras en estro y acostumbrándoles a la presencia y manipulación por parte del humano, proceso que puede llevarse una o dos semanas. No obstante, los machos también pueden aprender a montar objetos inanimados, facilitando así su manejo y evitando la necesidad de contar con hembras y la manipulación hormonal de las mismas. Sin embargo, lograr esto último, requiere de un proceso más largo y de la utilización de algunas técnicas de habituación y condicionamiento (Aguirre, 2004).

Electro-Eyaculador

En animales no acostumbrados al manejo humano es necesario recurrir a la obtención de semen mediante técnicas de electroeyaculación bajo anestesia quirúrgica (Garde et al., 1998). Esta técnica es segura, con riesgos mínimos, y se ha empleado ya en muchas especies animales. Con ungulados no se ha encontrado inconveniente alguno y se ha utilizado en forma reiterada sobre los mismos machos sin consecuencias negativas (Holt y Pickard, 1999), lo cual es importante ya que interesa realizar recolecciones repetidas de cada macho con el fin de conservar un elevado número de muestras para su utilización futura.

Masaje Rectal

Otro método de colección de semen en los animales es por masaje rectal. Aquellos reproductores que han tenido un adecuado descanso sexual, son dóciles y se manejan con calma, son buenos candidatos para esta técnica. También se recomienda en animales que posean lesiones dolorosas en cuartos posteriores. Sin embargo, posee varias desventajas y quizás no sea práctica en todas las situaciones. Algunas de las desventajas incluyen irritación de la mucosa rectal, falta de protrusión del pene que resulta en muestras contaminadas desde el prepucio, la necesidad de una segunda persona para la colección de la muestra y la dificultad de estimular machos excitados o de mal carácter (Aguirre, 2004).

Contención Química

Mundialmente se ha experimentado el uso de diversos narcóticos para inmovilizar ciervos, pero no todas las combinaciones de fármacos han tenido éxito. Los opiodes son seguros para a inmovilización de animales salvajes, Miller *et al.* (2004) probó sustancias como: etorphine, fentanyl y carfetanil, aunque (Haigh y Hudson, 1993) demostró su potencial toxicidad en humanos, además que, Los opiodes necesitan un permiso especial para ser adquiridos y no son muy accesibles en muchos países. En Europa comúnmente los ciervos son inmovilizados con xylazine y ketamina (Jalanka y Roeken, 1990; Javovsky, 1996). Sin embargo, el uso de alfa – 2 agonista adrenoreceptores han fallado al ser empleados en ciervos salvajes y de corral (Haigh y Hudson, 1993).

Xylazine (Tranquivet®) y tiletamine – zolazepam (Telazol®) se ha empleado para inmovilizar elks (*Cervus elaphus nelsoni*), (Millspaugh *et al.*, 1999) y en venado cola-blanca (*Odocoileus virginianus*) (Kilpatrik y Spohr, 1999).

La combinación de tiletamine – zolazepam inyectable como inductor anestésico, actúa de forma rápida y uniforme. La combinación de Zoletil® y xylazine, en volúmenes pequeños, induce un mejor relajación muscular y anestesia profunda, en comparación al uso exclusivo de Zoletil® (Thurmon *et al.*, 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento I

Procedimiento para obtención, preparación y evaluación de la movilidad masal y concentración de espermatozoides de la cola del epidídimo *post-mortem* en carneros.

...Obtención de Muestras

Los testículos de 10 carneros fueron obtenidos de animales provenientes del rastro municipal de Fresnillo, Zacatecas, México, ubicado en la Carretera Plateros s/n Colonia Arboledas; en la latitud 23° 10', longitud 102° 52', altitud 2185m, el Clima es templado regular semi-seco con una máxima 18.6 y una mínima 3.1°C, la precipitación media anual es de 40.4mm (inifap 2010). En los meses de junio y julio del 2011. Los 10 pares de testículos (10 X 2) fueron colectados inmediatamente después del sacrificio de los borregos, los testículos fueron ligados con hilo de algodón, en sus venas y conducto deferente, fueron colocados en hielera, la cual contenía en su fondo refrigerantes de gel congelados, cubiertos de una capa de cartón, y por encima de ésta se colocaron los testículos, los cuales fueron transportados al laboratorio, en un recorrido no mayor a 2 horas, donde se procesaron para obtener los espermatozoides de la cola del epidídimo.

Preparación de Muestras

Ingresados los testículos al laboratorio, se trabajo dentro de una cámara fría a 5°C para mantener la temperatura de los testículos. Los epidídimos que fueron ligados se separaron de los testículos, Los espermatozoides de la cola del epidídimo se obtuvieron por perfusión, introduciendo una cánula por el conducto deferente y dejando correr 3 mL de Triladyl® sin yema de huevo. Se mezclaron de manera homogénea las muestras de los dos epidídimos de cada borrego y posteriormente centrifugados a 350 x g durante 15 min. Los espermatozoides se recuperaron después de extraer el sobrenadante producto de la centrifugación, se les añadió 1 mL de SGSA y 1 mL de Triladyl® con yema de

huevo, como capacitador espermático, las muestras se mantuvieron en todo momento a 5°C y todos los materiales o sustancias que estuvieron en contacto con los espermatozoides, estuvieron atemperados a 5°C.

Tratamientos

Los tratamientos a probar sobre las unidades de muestreo fueron sujetos previamente al lavado, centrifugación y adición de la SGSA y Triladyl®. A cada unidad de muestreo (10) se le aplicó los 4 tratamientos probados que consistieron en diferentes tiempos de refrigeración (0, 6, 12 y 24 h) a 5°C.

VARIABLES DE RESPUESTA

Movilidad individual (%). Se evaluó en porcentaje de acuerdo con la proporción de espermatozoides que se movieron de forma lineal progresiva en un campo visual microscópico de 10 x 40 (Alvariño, 1993). Para calcular la concentración espermática se utilizó un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Análisis estadístico

Los valores obtenidos de la variable de respuesta estudiada, fueron analizados empleando un diseño para un modelo completamente al azar ($Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$) con 4 tratamientos (tiempos de refrigeración) y 10 repeticiones por tratamiento. A cada unidad de muestreo (contenido espermático en epidídimos) se le aplicó los cuatro tratamientos para obtener homogeneidad entre las unidades de muestreo.

Para conocer la significancia del efecto de los tratamientos, se realizó un ANOVA para un diseño completamente al azar, con el paquete estadístico SAS. De existir diferencia entre tratamientos, se realizó una prueba de rango múltiple de Duncan ($p \leq 0.05$) para seleccionar el(los) mejor(e)s tratamientos para las variables estudiadas con el paquete estadístico STATISTICA.

Experimento II

Procedimiento para obtención, preparación y evaluación de la movilidad masal y concentración de espermatozoides de la cola del epidídimo *post-mortem* de venado cola blanca.

Obtención de la muestra

Los testículos de dos venados cola blanca (*O. v. couesi*) fueron obtenidos de producto del aprovechamiento cinegético 2010 en la UMA Rancho Antrialgo, ubicada en la Sierra Fría localizada al noroeste del estado de Aguascalientes caracterizada por ser un macizo de vegetación templada rodeado de zonas áridas, forman parte de la provincia geográfica de la Sierra Madre Occidental, entre los paralelos 102° 41' 19" y 102° 25' 40" latitud norte y los meridianos 22° 30' 41" y 22° 01' 09" longitud oeste. De acuerdo con la clasificación climatológica de Köppen modificada por García (1988) el clima es extremoso de tipo C(w1)b(e)g templado subhúmedo con lluvias en verano, temperaturas promedio 15.5 °C, precipitación anual de 720 mm y precipitación invernal equivalente al 9 % anual (Gobierno del estado de Aguascalientes, 1993). En el mes de enero del 2011. Los 2 pares de testículos (2 x 2) fueron colectados inmediatamente después del sacrificio de los venados adultos, los testículos se ligaron con hilo de algodón, en sus venas y conducto deferente, se colocaron y transportaron al laboratorio en hielera, la cual contenía en su fondo refrigerantes de gel congelados, cubiertos de una capa de cartón, y por encima de ésta capa se colocaron los testículos, para su transporte al laboratorio, que no duró más de 6 h, donde fueron procesados para obtener los espermatozoides de la cola del epidídimo.

Preparación de Muestras

Ingresados los testículos al laboratorio, se trabajo dentro de una cámara fría a -5°C para que la temperatura de los testículos se mantenga durante todo el proceso. Los epidídimos que han sido ligados se separaron de los testículos, Los espermatozoides de la cola del epidídimo se obtuvieron por perfusión, introduciendo una cánula por el conducto deferente y dejando correr 3 ml de biladyl® en solución sin yema de huevo. Se mezclaron de manera homogénea las

muestras de los dos epidídimos de cada venado y se centrifugaron a 350 x g durante 15 min. Posteriormente, los espermatozoides se recuperaron después de extraer el sobrenadante producto de la centrifugación, se le agregó 1ml de biladyl® con yema de huevo las muestras se mantuvieron en refrigeración a 5°C hasta el momento de la evaluación.

Tratamientos

Los tratamientos a probar sobre las unidades de muestreo fueron sujetos previamente al lavado, centrifugación y adición de Biladyl®. A cada unidad de muestreo (2) se le aplicó los 1 tratamientos probados que consistieron en el tiempo 0 de refrigeración (el momento del lavado) a 5 ° C.

Variables de Respuesta

Motilidad individual. Se evaluó en porcentaje de acuerdo con la proporción de espermatozoides que se movieron de forma lineal progresiva en un campo visual microscópico de 10 x 40 (Alvariño, 1993). Para calcular la concentración espermática se utilizó un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Análisis Estadístico

Los valores obtenidos de las variables de respuesta estudiadas, fueron analizados empleando por la media aritmética ($\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$), con 1 tratamientos (tiempo 0 de refrigeración) en 2 repeticiones por tratamiento.

Experimento III

Evaluación de diez eyaculados obtenidos por electro-eyaculación de venado cola-blanca.

Obtención de los Eyaculados

En los meses de octubre a diciembre del 2010 y enero del 2011, se emplearon 10 venados cola blanca de la subespecie miquihuanansis (*O. v. miquihuanensis*) en el laboratorio de la UMA “Módulo de Producción de Venado La Huerta” del Colegio de Postgraduados, Campus S.L.P., México. Las coordenadas geográficas son 22° 34' de latitud norter y 1001° 45' de longitud oeste, a una altura de 2090 msnm, con un clima B5.0KW(e), semiárido con lluvias en verano, con una precipitación anual que oscila entre los 330 y 400mm y una temperatura media anual entre los 12° y 18°C.

Contención Química y Obtención de la Muestra

Los eyaculados fueron obtenidos mediante la inmovilización química por vía intramuscular con dardos de 3ml x 13mm de la marca Cap-Chur® aplicados con un rifle Dan-Inject® Modelo JM Estándar. El fármaco empleado fue Clorhidrato de Ketamina (7.5 mg/kg) combinado con Clorhidrato de Xilacina (1.5 mg/Kg), de acuerdo a lo reportado por (Kreeger 2002). Antes de la toma de muestra se realizo la tricotomía en la zona del prepucio y se limpio. En seguida se estimulo el recto para eliminar las heces, se invagino el glande del pene, la base del pene se sostuvo con una gasa (Drew y Amass, 2004). En seguida, se procedió a estimular vía rectal a los venados con electro-eyaculador. El semen obtenido fue evaluado de acuerdo a su motilidad individual y concentración espermática, siguiendo los procedimientos antes mencionados.

Variables de Respuesta

La motilidad individual se evaluó en porcentaje de acuerdo con la proporción de espermatozoides que se movieron de forma lineal progresiva en un campo visual microscópico de 10 x 40 (Alvariño, 1993). Para calcular la concentración espermática se utilizará un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Análisis Estadístico

Los valores obtenidos de la variable de respuesta estudiada, en las 10 repeticiones (eyaculados), con un tratamiento, fueron analizados por la media aritmética ($\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$) y desviación estándar ($s = \sqrt{\frac{\alpha - s^2/n}{n-1}}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento I. Movilidad masal y concentración de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo *postmortem* de carneros.

El valor más alto de concentración espermática del lavado de epidídimos de carneros *postmortem* fue de 2680×10^6 espermatozoides/mL y el más bajo de 750×10^6 espermatozoides mL^{-1} , el promedio fue de $1,732.5 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} . En el cuadro 1 se puede ver la concentración espermática de cada repetición. Dong *et al.* (2008) obtuvieron 920×10^6 espermatozoides/mL como media de la concentración espermática; empleando la técnica del lavado de epidídimos en caja de petri y mediante incisiones en la parte caudal del epidídimo, con el cual se corre el riesgo de contaminar la muestra. Como medio de lavado emplearon 8mL solución tamponada (Dulbecco phosphate-buffered saline-DPBS), la suspensión resultante se centrifugó y el sedimento se diluyó a razón de 1:20 (vol/vol) con medio Tyrode suplementado con suero de albumina bovina y 3% de glicerol. Con el método de lavado empleado en el presente trabajo, se obtuvieron mejores resultados, dado que, no se realizan incisiones es difícil que se contamina la muestra, además que solo empleamos 3mL de Triladyl® y obtuvimos concentraciones espermáticas mayores.

Cuadro 1. Concentraciones espermáticas de cada repetición, evaluada en el momento

del lavado de los epidídimos *postmortem* de carneros

Concentración Espermática 1000x10 ⁶ espermatozoides mL de borregos post- mortem.	
1	1.245
2	0.85
3	0.965
4	0.820
5	1.805
6	0.75
7	2.665
8	2.68
9	1.655
10	1.225
\bar{X}	1.466

El comportamiento de la movilidad masal a diferentes tiempos (0, 6, 12 y 24 horas) de refrigeración (5°C) en espermias provenientes del lavado de epidídimos de carneros *postmortem*; indicó que a mayor tiempo en refrigeración la movilidad masal disminuía (P=0.67), como se puede observar en la figura 3. El efecto del tiempo en refrigeración a 5°C a las 0, 6, 12 y 24 horas, se observa con las medias de la movilidad masal en cada tratamiento fue de 83.5, 82, 80.5, 78.1% respectivamente (Figura 3). Estos resultados son similares a los reportados por Garde *et al.* (1994), en donde la movilidad después de 2, 24 y 48 h en refrigeración fue de un 87.1%, 82.4% y 75.9% respectivamente. Dong *et al.* (2008) evaluaron la movilidad masal en el tiempo 0 h y 24 h a 10, 4 y 0°C; a 10°C obtuvieron 87.5% y 77.5% de movilidad masal; a 4°C la movilidad masal fue de 81.6% y 70.4%; las muestras refrigeradas a 0°C fueron las que presentaron menor movilidad masal con 77.5% y 48.33%; por lo que recomiendan emplear el protocolo a 4°C. Aunque, los valores que obtuvieron a 10°C son muy similares. En un estudio en venado rojo, Soler *et al.* (2003) encontraron que el lavado de

epidídimos se realizó 2 horas después de la muerte del animal, con medio de yema de huevo y citrato de sodio, todas las variables de movilidad de los espermatozoides se fueron disminuyendo en cuanto aumentaba el tiempo de refrigeración, a las 0 h el porcentaje de espermatozoides vivos fue de ~83% y a las 40 h de refrigeración fue de ~40%.

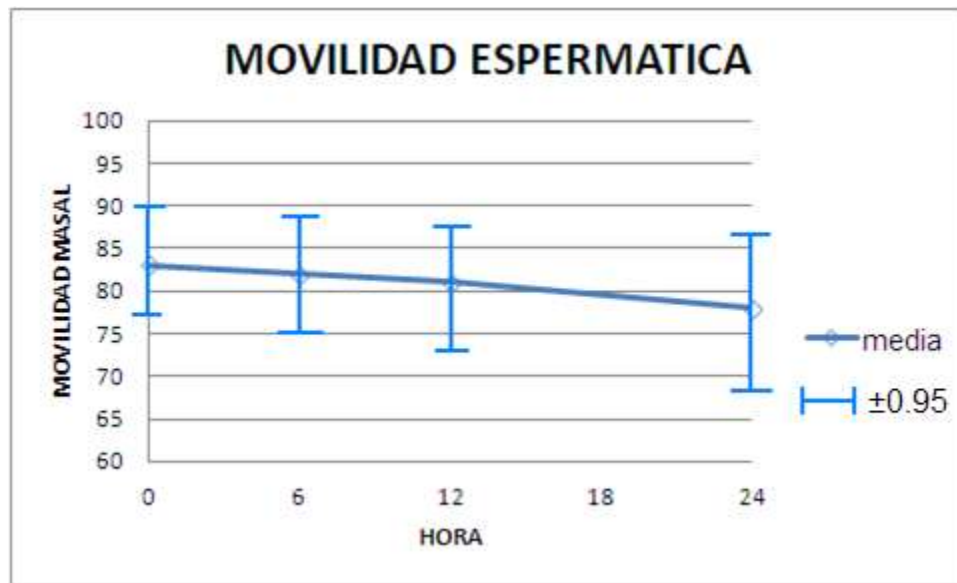


Figura 3. Comportamiento de la movilidad masal a diferentes tiempos (0, 6, 12 y 24 h) de refrigeración (5°C) en espermias provenientes del lavado de epidídimos *post-mortem* de carnero.

La relación entre los tiempos de refrigeración y la movilidad masal del semen obtenido *post-mortem* por lavado de epidídimos de carneros es débil (R^2 ajustada = 0.01580).

Songsasen *et al.* (1998) mantuvieron cadáveres de ratones a 22°C durante 24 h y posteriormente obtuvieron espermatozoides que fertilizaron el 20% de 166 ovocitos. Kishikawa *et al.* (1999) recomiendan la ICSI de espermatozoides para conservar el germoplasma de animales en peligro de extinción, debido a los resultados obtenidos en ratones con 20 días *post-mortem* en refrigeración a 4°C, la fertilización de los ovocitos fue mayor al 80%. Amann *et al.* (1983) realizaron lavados de la cola del epidídimo de borregos, inmediatamente después de la muerte del animal, con 15 mL de buffer, centrifugaron las muestras a 350 x g por 10 minutos, y al recuperar el paquete celular se resuspendió con 0.5-2.0 mL de buffer. Obtuvieron una

concentración espermática de $7-15 \times 10^8$ espermatozoides mL con movilidad masal del 80-92%.

Los espermatozoides del epidídimo no estuvieron en contacto con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias; las cuales modifican la sensibilidad a la congelación y la resistencia al enfriamiento (Schmehl, 1986), en el presente trabajo empleamos un diluyente comercial junto con SGSA de carnero, por tanto al no presentar una diferencia significativa entre los tratamientos, podemos considerar que el lavado de epidídimos fue bueno, posiblemente porque tanto el diluyente como las SGSA protegieron a los espermatozoides del choque térmico; de la deshidratación que provoca el enfriamiento; de los cambios de volumen que afectan la presión osmótica de la célula y de los radicales libres.

Experimento II. Movilidad masal y concentración de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo *post-mortem* de venado cola blanca.

La movilidad masal y concentración espermática *post-mortem* obtenidos del lavado de epidídimos de venado, en las repeticiones 1 y 2, fueron de 50 y 60 %, 680×10^6 y 975×10^6 espermatozoides mL^{-1} , respectivamente (Cuadro 2). Aunque, fueron pocas unidades experimentales a las cuales tuvimos acceso y esto representa una limitante para poder comparar los resultados con otros trabajos. Sin embargo, podemos observar que el valor más bajo, en concentración espermática, reportado por Dong *et al.* (2008) fue de 90×10^6 espermatozoides mL, este valor está muy por debajo de lo obtenido en nuestro experimento en venado. Por tanto, el procedimiento por medio de la perfusión del conducto deferente con el medio Biladyl® lava mejor las cabezas del epidídimo, debido a que el medio corre por el ducto arrastrando consigo a los espermatozoides y el resultado son concentraciones espermáticas mayores.

Cuadro 2. Movilidad masal y concentración de espermatozoides obtenidos del

lavado de epidídimos *post-mortem* de venado.

Repeticiones	Variables	
Unidades experimentales venados	Movilidad Individual (%)	Concentración Espermática 1000×10^6 espermatozoides/mL
1	50	0.68
2	60	0.975
Media	55	0.8275

Los espermatozoides del venado cola blanca son semejantes a los espermatozoides de los humanos y ovinos (López-Fernández *et al.*, 2008a), en el eyaculado de carnero y venado cola blanca la fragmentación del ADN es menor que en los equinos y humanos (López-Fernández *et al.*, 2007; González *et al.*, 2009) y es similar a los caprinos y bovinos (González *et al.*, 2011). La movilidad espermática fue muy baja, en venado, en comparación con los resultados obtenidos en carneros, y se puede observar que el lavado y diluido con Triladyl® y SGSA a 5°C dio mejores resultados en los carneros, que el lavado con biladyl® a -5°C en los venados.

Experimento III. Movilidad masal y concentración espermática de eyaculados obtenidos por electro-eyaculación de venado cola-blanca.

En los espermatozoides de venado obtenido por electro-eyaculación, la movilidad masal osciló entre 80 a 98 %, con una media de 91.8%. En el cuadro 3 se pueden ver los resultados de cada repetición.

Cuadro 3. Movilidad masal de espermatozoides de venado obtenidos por electro-

eyaculación.

Movilidad Individual % espermática de venado	
1	95
2	95
3	90
4	95
5	95
6	85
7	90
8	80
9	95
10	98
\bar{X}	91.8± 5.59

La concentración de espermática se encuentra en el cuadro 4 en el cual podemos ver que la concentración más alta se presentó en la repetición 5 con 7365×10^6 espermatozoides mL y la más baja en la repetición 1 con 2330×10^6 espermatozoides mL y la media de las 10 repeticiones fue de 4453.8×10^6 espermatozoides mL. *Garde et al.* (2003) realizaron evaluaciones de movilidad y concentración espermática en fresco de eyaculados de tres especies diferentes de gacelas: *G. cuvieri* con $81.1 \pm 2.0\%$ y $552.2 \pm 138.5 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} ; en *G dama* reportaron $81.5 \pm 4.0\%$ y 1462.2 ± 194.4 espermatozoides mL^{-1} y *G dorca* presentó $78 \pm 3.3\%$ y $740.2 \pm 203.1 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} . El semen fue colectado con electroeyaculador, los animales se anestesiaron quirúrgicamente empleando xylazine (0.2 mg kg^{-1} de PV) y clorhidrato de ketamine (15 mg kg^{-1} de PV). Las muestras no se contaminaron con orina y el máximo voltaje y amperaje empleado en cada especie de Gasela fueron: 5 V, 70 mA *G. cuvieri*; 6.5 V, 130 mA *G. dama*, 4 V y 60 mA para *G. dorca*. Las variaciones en la calidad del semen se

reportan como diferencias de los individuos y de la especie, aunque emplearon protocolos diferentes. Con la metodología que se empleo en el presente trabajo en venado cola blanca, la movilidad masal y las concentraciones espermáticas fueron superiores a los reportados por Garde *et al.* (2003).

Cuadro 4. Concentración espermática de eyaculados de venado obtenidos por electro-eyaculación.

Concentración espermática 1000 $\times 10^6$ espermatozoides /mL de venado	
1	2.33
2	2.984
3	2.51
4	5.109
5	7.365
6	4.6
7	4.585
8	5.085
9	6.73
10	3.24
\bar{X}	4,453.80 $\times 10^6$ $\pm 1,714.15 \times 10^6$

Por otro lado, Kjelland *et al.* (2011) evaluaron un eyaculado de venado cola blanca como bueno por su color, consistencia y movilidad espermática (>~80%); aunque criopreservaron eyaculados con un margen de movilidad espermática de 45% a 80%. En cuanto a la concentración espermática la más alta fue de 1433×10^6 espermatozoides mL⁻¹ y la menor de

459×10^6 espermatozoides mL^{-1} . En sus experimentos emplearon como diluyente biladyl® ó solución TRIS (200mM tris, 65.7mM ácido cítrico, 55.5 mM fructosa, 20% vol/vol). No obstante, con la metodología empleada en esta investigación, se obtuvieron mejores concentraciones espermáticas y una movilidad masal más elevada.

CONCLUSIONES

Los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo *post-mortem* de carneros, recuperados con lavados usando Triladyl® y SGSA en el intervalo de 24 h en refrigeración a 5°C pueden ser prospectos para la inseminación artificial, debido a que no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos probados. En las muestras de espermatozoides obtenidas de la cola del epidídimo *post-mortem* de venado cola blanca mostraron resultados bajos en cuanto a movilidad masal y concentración espermática. Sin embargo, debido a que los datos sobre el lavado del epidídimo en venado cola blanca fueron insuficientes, es necesario llevar a cabo investigación con un número mayor de muestras siguiendo el protocolo empleado para carneros en el presente trabajo. Por otro lado, los resultados obtenidos de los eyaculados de venado cola blanca mostraron una movilidad masal promedio de $91.8\% \pm 5.59$ y una concentración espermática promedio de $4,453.80 \times 10^6 \pm 1,714.15 \times 10^6$ espermatozoides mL⁻¹, lo que ubica al semen como de buena calidad, por lo que se propone que el semen fresco de venado cola blanca obtenido por electroeyaculación es recomendable para su conservación y uso posterior en inseminación artificial.

LITERATURA CITADA

Agca Y., Gilmore J., Byers M., Woods E. J., Liu J. y Critser J. K.. 2002. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars (Online). *Biology of Reproduction* 67 1493–1501. www.highwire.edu (2011, diciembre 10).

Aguirre F. V. 2004. Efectos de la estacionalidad, frecuencia de colección y jerarquía en algunas variables reproductivas de carneros Pelibuey (*Ovis aries*). (Online). Tesis. Universidad de colima. www.google.com (2011, noviembre15).

Amann R. P. y Schanbacher B. D.. 1983. Physiology of male reproduction (online). *J. Animal science* vol57, suppl. 2:380-403. www.highwire.edu (2011, marzo 4)

Anel L., Guerra, C., Álvarez M., Anel E., Martínez A. F., Boixo J. C., Kaabi, M., Hernández, P. y Paz, P.. 2002. Effect post-mortem interval on quality of epididymal spermatozoa in iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) (online). *Theriogenology*. 57:577. www.highwire.edu (2011, marzo 4)

An T. Z., Wada S., Edashi K., Sakurai T., Kasai M.. 1999. Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death (Online). *Cryobiology* 38:27-33. www.highwire.edu (2009, octubre 10).

Al-Hajj M., Becker M. W., Wicha M., Weissman I. y Clarke M. F.. 2004. Therapeutic implication of cancer stem cells (online). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 43 -47. www.highwire.edu (2010, diciembre 7).

Alvarez J. O., Touchstone J. C., Blasco L., Storey B. T.. 1987 Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *Superoxide*

dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity(online). *JAndrol.* 8:338-348. www.highwire.edu (2009, octubre 10).

Alvariño R.M. 1993. Control de la reproducción en el conejo. Ed. Mundi Prende. 65p.

Barrios A. D. R.. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem (online). Memorias XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera 22 al 26 de Octubre. ULA-Trujillo http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf (2009, Octubre 2010).

Bergeron A., Crete M. H., Brindle Y. y Manjunath P.. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction* 70:708–717.

Bruce A., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D.. 1994, *Molecular biology of the cell*, third edition. New York. Garland publishing. Vol. 24, No. 5, pag. 135-160.

Carr D. W., Usselman M. C., Acott T. S.. 1985. Effects of pH, lactate and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison (online). *Biol Reprod.* 33:588–593. www.highwire.edu (2009, octubre 10).

Chakrabarty J., Banerjee D., Pal D., Ghosh A. y Majumder G. C.. 2007. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology* 54:27–35.

Chenoweth P.. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En : Younquist:currenttherapy in large animal theriogenology. Saunders, 1 Edicion, Pag. 217.

Clemente S., Guadarrama E., De la Garza M., De la Garza G., Aguirre B. y Díaz S. 2008. Manual de manejo intensivo de venado. Anahuac, Nuevo León, México. Pag. 17, 37, 45 y 47.

Coelingh, J. P., Monfoort, C. H., Roziji, T. H., Leuven, J. A. G., Schiphof, R., SteynParve, E. P., Braunitzer, G., Schrank, B. y Ruhfus, A.. 1972. The Complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa (online). *Biochim Biophys Acta* 285:1-14. www.highwire.edu (2010, diciembre 7).

Cooper T. G.. 1998. Epididymis. en: Knobil E, Neill J. D., eds. *Encyclopedia of Reproduction*, Vol. II. San Diego: Academic Press1–17.

Cooper T. G. y Barfield J. P.. 2006. Utility of infertile male models for contraception and conservation (online). *Molecular and Cellular Endocrinology* 250: 206–211. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

Cooper T. G., Yeung C. H., Wagenfeld A., Nieschlag E., Poutanen M., Huhtaniemi I. y Sipila P.. 2004. Mouse models of infertility due to swollen spermatozoa (online). *Molecular and Cellular Endocrinology* 216 55–63. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

Critser J. K., Huse-Benda A. R., Aaker D. V., Ameson B. W. y Ball G. D.. 1988. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility (online). *Fertil Steril*; 50:314–320. www.highwire.edu (2010, diciembreo 20).

De Leeuw F. E., Chen H. C., Colenbrander B. y Verkleij A.J. 1990 Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27:171–183.

Devireddy R, Swanlund D, Roberts K, Bischof J. 1999. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents (online). *Biol Reprod* ; 61:764–775. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

Devireddy R. V., Fahrig B., Godke R. A. y Leibo S. P.. 2004. Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates. *Mol Reprod Dev* 67:446–457. www.highwire.edu (2010, diciembre 20).

Dong Q., Rodenburg S. E., Huang C. y Vandervoort C. A. 2008. Cryopreservation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) epididymal spermatozoa before and after refrigerated storage (online). *Journal of Andrology* 29: 283-292. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

Drevius L. O. 1971. Permeability coefficients of bull spermatozoa for water and polyhydric alcohols (online). *Experimental Cell Research* 69 :212–216. www.high-wire.edu (2010, diciembre 20).

Drevius L. O. 1972. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models(online). *Journal of Reproduction and Fertility* 28: 41–54. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

Drobnis E. Z., Crowe L. M., Berger T., Anchordoguy T. J., Overstreet JW & Crowe JH 1993 Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology* 265:432–437.

Du J., Tao J., Kleinhans F. W., Mazur P. y Critser J. K.. 1994. Water volume and osmotic behaviour of mouse spermatozoa determined by electron paramagnetic resonance. *Journal of Reproduction and Fertility* 101 37–42. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

Dumoulin J. C., Bergers-Janssen J. M., Pieters M. H., Enginsu M. E., Geraedts J. P. y Evers J. L.. 1994. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos (online). *Fertil Steril*; 62:793–798. www.highwire.edu (2011, febrero 20)

Fernández-Santos M. R., Estes M. C., Soler A. J., Montoro V. y Garde J. J.. 2005. The effects of different cryoprotectants and the temperature of addition on the survival of red deer epididymal spermatozoa (Online). *CryoLetters*. 26: 25 –32. www.highwirw.edu (2009, Octubre 10).

Fernández-Santos R. M., Martínez-Pastor F., García-Macías V., Estes C. M., Soler J. A., Paz P., Anel L., y Garde J. J.. 2007. Sperm Characteristics and DNA Integrity of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Spermatozoa Frozen in the Presence of Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants. *Journal of Andrology*, Vol. 28, No. 2, 294-305. www.highwire.edu (2010, diciembre 8).

Free M. J., Schluntz G. A. y Jaffe R. A.. 1976. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol Reprod*. 14:481–488. www.high-wire.edu (2011, febrero 20).

Gao D. Y., Liu J., Liu C., McGann L.E., Watson P., Kleihans F. W., Mazur P., Critser E. S. y Critser J. K.. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol(online). *Human Reproduction* 10 1109–1122. www.highwire.edu (2009, septiembre 18).

Gao D, Mazur P. y Critser J. K.. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian Spermatozoa (online). In *Reproductive Tissue Banking*, pag. 263–328. www.high-wire.edu (2011, febrero 20).

García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köpen, para adaptarlo a las condiciones climáticas de la República Mexicana. Instituto de Geografía, UNAM. México. 113 p.

Garde J. Aguado M. Montoso V., Pérez G. M., García O., Pérez S. y Garzón, J.. 1994. Estudio post mortem de la viabilidad y del poder fecundante del semen de morueco. Resultados preliminares (online). In: proceeding of the XVIII Jornadas de la SEOC. España. p.533-537. www.google.com (2010, diciembre 8).

Garde J. J., Soler A. J., Cassinello J., Crespo C., Malo A. F., Espeso G., Gomendio M. Y Roldan E. R. S.. 1998. Sperm cryopreservation of selected african mammalian spermatozoa and its role in biodiversitypreservation through the development of genome resource banking (online). *Anim reprod sci* 53: 277-297. www.highwire.edu (2010, diciembre 8).

Garde J. J., Soler A. J., Cassinello J., Crespo C., Malo A. F., Espeso G., Gomendio M. Y Roldan E. R. S.. 2003. Sperm Cryopreservation in Three Species of Endangered Gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorrr*, and *G. dorcas neglecta*)(online). *Biology of Reproduction* 69, 602–611. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

Gilmore J. A., Liu J., Dao D. Y. y Critser J. K.. 1997, Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa (online). Hum Reprod; 12:112–118. www.highwire.edu (2009, septiembre 18).

GOBIERNO DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES. 1993. Estudio para la declaratoria de la Sierra Fría como área natural protegida. Secretaría de Desarrollo Social. Aguascalientes, Aguascalientes. 286 p.

González J. E., Cortes-Gutiérrez R., Rocío Núñez, J. L., Fernandez, P., Caballero, C., Lopez-Fernandez, y Holt W. V.. 2009. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. Fertil. Steril. 92:1915–1919. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

González J., Ramírez M. A., López-Fernández C., Crespo F., Evans K. M., Kjelland M. E. Y Moreno J. F.. 2011. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II(online). Dynamic features. Theriogenology 75:206–211. www.highwire.edu (2011, octubre 1).

Hagiwara M., Choi J. H., Devireddy R. V., Roberts K. P., Wolkers W. F., Makhoulouf A. y Bischof J. C.. 2009 Cellular biophysics during freezing of rat and mouse sperm predicts post-thaw motility. Biology of Reproduction 81:700–706.

Hafez E. S. E. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-hill **p**

Haigh, J. C., y Hudson R. J.. 1993. Chemical restraint. *In* Farming wapiti and red deer (online). J. C. Haigh, and R. J. Hudson (eds.). Mosby, St. Louis, Missouri, pp. 83–99. www.highwire.edu (2011, febrero 20).

Hammerstedt R. H., Graham J. K., Nolan J. P.. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Andro 11:73-88. www.highwire.edu (2009, septiembre 18).

Hernández-Pérez O. y Ballesteros L. M.. 1998, Biología molecular del espermatozoide de mamíferos. Universidad Autónoma Metropolitana. Pag.193-222. www.highwire.edu (2009, octubre 22).

Hishinuma, M., Suzuki, K. y Sekine J.. 2003. Recovery and cryopreservation of sika (*Cervus Nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 C (online). *Theriogenology* 59: 813-820. www.highwire.edu (2009, septiembre 18).

Holt W. V.. 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa (online). *Reprod Fertil Dev*; 9:309–319. www.highwire.edu (2010, noviembre 6).

Holt W. V.. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences (online). *Theriogenology*; 53:47–58. www.highwire.edu (2010, marzo 25).

Holt W. V.. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen (online). *Anim Reprod Sci*; 62:3–22. www.highwire.edu (2010, diciembre 8).

Holt W. V. y North R. D. 1984 Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze fracture study. *Journal of Experimental Zoology* 230:473–483.

Holt W. V. y North R. D.. 1988 The role of membrane active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage. *Gamete Research* 19:77–89.

Holt W. V. y Pickard R. A. 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation (online). *Reviews of Reproduction* 4:143–150. www.highwire.edu (2009, septiembre 18).

Janovsky M. 1996. Medikamentelle Immobilisation sowie Narkoseantagonisierung und Überwachung beim Rot- (*Cervus elaphus*) und Rehwild (*Capreolus capreolus*) (online). Thesis, School of Veterinary Medicine, University of Vienna, Vienna, Austria, 120 pp. www.highwire.edu (2011, octubre 1).

Jalanka H. y Roeken B. O.. 1990. The use of medetomidine, medetomidine-ketamine combinations, and atipamezole in nondomestic mammals: a review (online). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 21: 259–282. www.highwire.edu (2010, diciembre 8).

Johnson M. y Everitt B. 1980. essential reproduction. Blackwell Scientific Publications, 1ª edición, pag 33.

Johnson L. A., Weitze K. F., Fiser P. y Maxwell W. M.. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62:143–172.

Kaabi M., Paz P., Alvarez M., Anel E., Boixo J. C., Rouissi H., Herraes P. y Anel L.. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem (Online). *theriogenology* 60: 1249-1259 www.highwire.edu (2009, Octubre 10).

Kasai M., Komi J. H., Takakamo A., Tsudera H., Sakurai T. y Machida T.. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without

appreciable loss of viability (online). *J Reprod Fertil*; 89:91–97. www.highwire.edu (2011, octubre 1).

King G.S. 1993. *Reproduction in domesticated animals*. Editorial Elsevier science publishers B.V. pag 83-96.

Kilpatrick, H. J., y Spohr S. M.. 1999. Telazolxylazine versus ketamine-xylazine: a field evaluation for immobilizing white-tailed deer (online). *Wildlife Society Bulletin*, 27: 566–570. www.highwire.edu (2011, febrero 10).

Kishikawa H., Tateno H. y Yanagimachi R.. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 C (online). *J. Reprod. Fertil.* 116:217-222. www.highwire.edu (2010, diciembre 8).

Kjelland M. E.,González-Marín C., Gosálvez J., López-Fernández C., Lenz R. W., Evans M. y Moreno J. F.. 2011. DNA fragmentation kinetics and postthaw motility of flow cytometric-sorted white-tailed deer sperm. *Journal of Animal Science*. 89:3996-4006. (2010, noviembre 6).

Kistler W. S., Geroch M. E. y Williams-Ashman H. G.. 1973. Specific basic proteins from mammalian testis: isolation and properties of small basic proteins from rat testis and epididymal spermatozoa (online). *Bio. Chem.* 248:4532-4543. www.Highwire.edu (2010, noviembre 6).

Knaus H. G., Koch R. O., Eberhart A., Kaczorowski G. J., Garcia M. L. y Slaughter R. S.. 1995. [125I]margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltage-gated potassium channels in mammalian brain (online). *Biochemistry* 34: 13627–13634. www.Highwire.edu (2010, diciembre 10).

Koshimoto C., Gamliel E. y Mazur P. 2000. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose (online). *Cryobiology*; 41: 204–231. www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation (Online). *Cryobiology*; 43:21–31 www.highwire.edu (2009, Octubre 10).

Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi T., Cerolini S., Penny P. y Noble R.. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63:411–421.

Martínez-Pastor F., García-Macias V., Álvarez M., Herraéz P., Anel L. y De Paz P.. 2005a. **Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process** (Online). *Biol Reprod*; 72: 316 – 327 www.highwire.edu (2009, Octubre 10).

Martínez-Pastor F., Ana R. Díaz-Corujo, Anel E., Herraéz P., Anel L. y de Paz P.. 2005b. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of iberian red deer epididymal sperm (Online). *Theriogenology* 64:958-974 www.highwire.edu (2009, Octubre 10).

Martínez-Pastor F., Guerra C., Kaabi M., Díaz A.R., Anel E., Herraéz P., de Paz P. Y Anel L. 2005c. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time (Online). *Theriogenology* 63:24-40 www.highwire.edu (2009 Septiembre 25).

Maxwell W. M. C. y Watson P. F.. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science* 42:55–65.

Mazur P., Katkov I. I., Katkova N., Critser J. K. 2000. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*. 40:187–209. www.highwire.edu (2009, Octubre 10).

Medina G y Ramírez C. 2010. Reporte agrometeorológico Febrero de 2010. Inifap.

Miller F. B., Muller L.I., Doherty T., Osborn A. D., Miller V. K. y Warren J. R.. 2004. Effectiveness of antagonists for tiletamine-zolazepam/xylazine immobilization in female white-tailed deer (online). *Journal of Wildlife Diseases*, 40(3), 2004, pp. 533–537. www.Highwire.edu (2010, diciembre 10)

Millspaugh J. J., Brundige G. C., Jenks J. A., Tyner C. L. y Hustead D. R.. 1995. Immobilization of Rocky Mountain elk with Telazol and xylazine hydrochloride, and antagonism by yohimbine hydrochloride. *Journal of Wildlife Diseases* 31: 259–262. www.highwire.edu (2009 Septiembre 25).

Moore A. I., Squires E. L. y Graham J. K.. 2005 Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51:241–249.

Neill D., Challis R.G., Kretser M., Pfaff W., Richards S., Plant M. y Wassarman M. 2006. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Vol I (tercera edición).

Noiles E. E., Bailey J. L. y Storey B. T.. 1995. The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0 °C (online). *Cryobiology* 32 220–238. www.Highwire.edu (2010, diciembre 10).

Noiles EE, Thompson KA & Storey BT 1997 Water permeability, L_p , of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with sperm cytoskeleton. *Cryobiology* 35 79–92.

Leahy T. y Gadella B. M., 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* (2011) 142 759–778.

Leibo S. P., Bradley L. 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon C (ed.), *The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications*. Vienna, IL: Cache River Press: 501–516. www.Highwire.edu (2010, diciembre 10).

Liebermann J., Nawroth F., Isachenko V, Isachenko E., Rahimi G. y Tucker M. J.. 2002. Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. *Biology of Reproduction* 67: 1671–1680. www.Highwire.edu (2009, septiembre 25).

Lopez-Fernandez C., Crespo F., Arroyo J. L., Fernandez, P., Arana S., Johnston D. y Gosalvez J.. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II: The stallion (online). *Theriogenology* 68:1240–1250. www.Highwire.edu (2010, diciembre 10).

Lopez-Fernandez C., Fernandez J. L., Gosalbez A., Arroyo F., Vazquez J. M. Y Gosalvez J.. 2008. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III: Ram (online). *Theriogenology* 70:898–908. www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Oldenhof H., Friedel K., Sieme H., Glasmacher B. y Wolkers W. F.. 2010. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 61:115–122.

Parinaud J., Vieitez G., Vieu C., Collet X. y Perret B.. 2000. Enhancement of zona binding using 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Human Reproduction* 15:1117–1120.

Petrunkina A. M., Jebe E. y Topfer-Petersen E.. 2005. Regulatorand necrotic volume increase in boar spermatozoa (online). *Journal of Cellular Physiology* 204 508–521. . www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Phelps M. J., Liu J., Benson J. D., Willoughby C. E., Gilmore J. A. y Critser J. K. 1999. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation (online). *Biology of Reproduction* 61: 1031–1041. . www.Highwire.edu (2010, febrero 6).

Ricker J. V., Linfor J. J., Delfino W. J., Kysar P., Scholtz E. L., Tablin F., Crowe J. H., Ball B. A. y Meyers S.A.. 2006 Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction* 74:359–365.

Rigau T., Rivera M., Palomo M. J, Fernandez-Novell J. M., Mogas T., Ballester J., Pena A., Otaegui P. J., Guinovart J. J. y Rodriguez-Gil J.. 2002 Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa (online). *Reproduction* 123: 579–591. www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Rothman, C. M. 1980. A method for obtaining viable sperm in the *postmortem* state (online). *Fertil Steril* 34:512. www.Highwire.edu (2010, febrero 6).

Roy Jones. 2004. Sperm Survival Versus Degradation in the Mammalian Epi-didymis: A Hypothesis (Online). *Biol Reprod*, Nov 71:1405–1411 www.higwire.edu (2009, Octubre 10).

Sabirov R. Z., Prenen J., Tomita T., Droogmans G. y Nilius B.. 2000. Reduction of ionic strength activates single volume-regulated anion channels (VRAC) in endothelial cells (online). *Pflugers Archiv* 439 315–320. www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Schmehl M. K. 1986. The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to test-yolk-glycerol extender on the post-thawing motility of ram spermatozoa (online). *Cryobiology*. 23: 512-517. www.Highwire.edu (2009, septiembre 25).

Shadan S., James P., Howes E. y Jones R.. 2004. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa.

Biology of Reproduction 71 253–265.

Songsasen N., Tong J., Laibo S. P.. 1998. Birth of live mice derived by vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to 24 h after death (online). *J Exp Zool* 280:189-196. www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Songsasen N. y Leibo S. P.. 1997 Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice (online). *Cryobiology* 35 255–269. . www.Highwire.edu (2010, octubre 20).

Soler J. A., Garcia J. A., Fernández-Santos R. M., Estes C. M. y Garde J. J.. 2003. Effects of Thawing Procedure on Postthawed In Vitro Viability and In Vivo Fertility of Red Deer Epididymal Spermatozoa Cryopreserved at 21968C (online). *Journal of Andrology*, Vol. 24, No. 5. www.Highwire.edu (2009, septiembre 25).

Soler J. A. y Garde, J. J. 2003. **Relationship Between the Characteristics of Epididymal Red Deer Spermatozoa and Penetrability Into Zona-Free Hamster Ova (online)**. *J Androl*, **24**: 393 - 400. www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Storey B. T., Noiles E. E. y Thompson K. A.. 1998 Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation (online). *Cryobiology* 37 46–58. . www.Highwire.edu (2011, marzo 21).

Thomas A. D., Meyers S. A. y Ball B. A.. 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65: 1531–1550.

Thurmon J. C., Nelson D. R. y Benson G. J. 1979. Spinal analgesia and sedation of goats with lignocaine and xylazine (online). *Veterinary Record*. **105**:278-280. . www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Travis A. J. y Kopf G. S.. 2002 The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *Journal of Clinical Investigation* 110:731–736.

Tsukaguchi H., Shayakul C., Berger U. V., Mackenzie B., Devidas S, Guggino W B, van Hoek A N & Hediger M A 1998 Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel

(online). Journal of Biological Chemistry 273: 24737–24743. www.Highwire.edu (2011, febrero 20).

Van Gestel R. A., Helms J. B., Brouwers J. y Gadella B. M.. 2005. Effects of methyl-beta-cyclodextrin-mediated cholesterol depletion in porcine sperm compared to somatic cells. Molecular Reproduction and Development 72:386–395.

Walton, A., 1930. The effect of temperature on the survival *in vitro* of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens (online). J Exp Biol 7:201-219. www.Highwire.edu (2011, marzo 21).

Walters E. M., Men H., Agca Y., Mullen S. F., Critser E. S. y Critser J. K.. 2005 Osmotic tolerance of mouse spermatozoa from various genetic backgrounds: acrosome integrity, membrane integrity, and maintenance of motility (online). Cryobiology 50 : 193–205. www.Highwire.edu (2010, diciembre 10).

Watson P. F.. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reproduction, Fertility, and Development 7:871–891.

Watson P. F. 1981 The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. Journal of Reproduction and Fertility 62:483–492.

Willoughby CE, Mazur P, Peter AT & Critser JK 1996 Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa (online). Biology of Reproduction 55: 715–727. www.Highwire.edu (2010, diciembre 10).

Witte T. S. y Schafer-Somi S.. 2007 Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 102:181–193.

Yeung C. H., Anapolski M., Sipila P., Wagenfeld A., Poutanen M., Huhtaniemi I., Nieschlag E. y Cooper T. G.. 2002. Sperm volume regulation: maturational changes in fertile and infertile transgenic mice and association with kinematics and tail angulation (online). *Biology of Reproduction* 67: 269–275. www.Highwire.edu (2010, febrero 10).

Yeung C. H., Anapolski M., Setiawan I., Lang F. y Cooper T.G.. 2004. Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volume regulation of fertile and infertile cross transgenic mice (online). *Journal of Andrology* 25: 216–223. www.Highwire.edu (2011, febrero 10).

Yu. I. y Leibo S. P., 2002. Recovery of motile, membrana-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 C (Online). *Theriogenology* 57:1179-1190 www.highwire.edu (2009, Septiembre 25).