

## PARÁMETROS TESTICULARES Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS OBTENIDOS *POSTMORTEM* EN EL TORO DE LIDIA

Testicular parameters and morphological characteristic of epididymal spermatozooids collected *post-mortem* in the bullfight

**G. D. Saavedra<sup>1</sup>, A. Mas<sup>1</sup>, J. M. Sanes<sup>1</sup>, P. Vallejo<sup>1</sup>, Matas C<sup>2</sup>, J. I. Seva<sup>\*1</sup>**

<sup>1</sup> Histología y Anatomía Patológica. <sup>2</sup>Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

\* **Autor para la correspondencia** y dirección actual: Juan Seva Alcaraz. Anatomía Patológica Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Campus de Espinardo. 30100-Murcia. Tlfno: +34868884701. Fax: +34868884147. e-mail: jseva@um.es

Historial del artículo:

Recibido: 27 enero 2012

Aceptado: 11 mayo 2012

### RESUMEN

En el presente trabajo se han evaluado determinados parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos *postmortem* en el toro de lidia, teniendo en cuenta la edad, el peso del animal, la circunferencia escrotal, peso y longitud testicular, y sus variables espermáticas. Se analizaron 12 pares de testículos de toros lidiados en una Plaza de Toros, procedentes de doce astados encaste Domecq de dos ganaderías. Una vez llegado el toro al desolladero de la plaza, se midió la circunferencia escrotal, se extrajeron los testículos y se conservaron a una temperatura de 5°C, previamente identificados. Posteriormente en laboratorio se realizó el pesaje y medición de cada testículo, se diseccionó la cola del epidídimo para conseguir la muestra. Se midió volumen, concentración espermática, motilidad. Por último se realizaron extensiones con la tinción de eosina nigrosina y se valoraron espermatozoides vivos y muertos, células normales, células anormales y acrosomas normales. La muestra obtenida de cada testículo, fue diluida en una proporción 1:2 con un diluyente comercial (Steridyl®), ambos atemperados a 37°C, antes de realizar las tinciones y las extensiones. Con el fin de estudiar las características espermáticas y los parámetros testiculares de toros de lidia provenientes de dos ganaderías, se realizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2 (dos ganaderías y dos testículos). Los resultados muestran que hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), de peso testicular entre

la ganadería 1 de  $467,33 \pm 17,89$  y la ganadería 2 de  $500,33 \pm 16,23$ . Para la variable circunferencia escrotal existen diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre la ganadería 1 de  $33,5 \pm 0,55$  y la ganadería 2 de  $36,5 \pm 1,52$ ; encontrándose la misma diferencia significativa para el peso del testículo derecho e izquierdo, entre la primera ganadería de  $295 \pm 4,56$  y  $293,5 \pm 4,41$ , y la segunda de  $323,17 \pm 14,61$  y  $321,12 \pm 14,93$  respectivamente. Para las demás variables evaluadas, concentración espermática, la motilidad individual, vivos y muertos, morfoanomalías y acrosomas normales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). En general, se encontró que en las variables que hubo diferencias estadísticamente significativas, siempre se presentaba entre ganaderías y no tuvo que ver nada el efecto testículo.

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

## ABSTRACT

In the present work has been evaluated testicular parameters and morphological characteristic different of epididymal spermatozooids collected postmortem in the bullfight as age and weigh animal, scrotal circumference, weigh and long testicular and spermatic variables. Twelve both testicles of bullfight coming from two farms of Domecq has been analyzed. After arrived of bullfight to slaughterhouse the scrotal circumference was measured and the testicles extracted and preserved to  $5^{\circ}$  C of temperature after yours identification. Afterwards the weigh and measures of each testicle was realized in the laboratory. The epididymal tail was dissected for to collect the sample. The spermatic volume and concentration and motility were measured. For last extension of eosin-nigrosin stamp were realized and life and dead spermatozooids, usual and unusual cells and usual acrosomes were determined. Before to stamp, the sample collected of each testicle was diluted 1:2 proportion with commercial diluted (Steridyl®) both moderating to  $37^{\circ}$ C. In order to study the sperm characteristics and testicular parameters of bullfighting coming from two farms, was a completely random arrangement design  $2 \times 2$  factorial (two farms and two testes). The results show that there are significant differences ( $p < 0,05$ ), testicular weight between livestock 1 of  $467,33 \pm 17,89$  and livestock 2 of  $500,33 \pm 16,23$ . For variable scrotal circumference, there are significant differences ( $p < 0,01$ ) between livestock 1 of  $33, 5 \pm 0, 55$  and livestock  $36,5 \pm 1,52$ ; finding the same significant difference for the weight of the right and left testicle between the first breeding of  $295 \pm 4, 56, 293, 5 \pm 4, 41$ , and the second in  $323, 17 \pm 14, 61$  and  $321, 12 \pm 14, 93$  respectively. For the other variables evaluated, sperm concentration, individual motility, alive and dead, morfoanomalias and normal acrosomas, no statistically significant differences were found ( $p < 0,05$ ). In general, it was found that in the variables that were statistically significant differences, always presented between farms and did not nothing to the testicle effect.

**Key Words:** testicle, *postmortem*, bullfight, spermatozoid, epididymal.

## INTRODUCCIÓN

La mejora de la crianza del ganado de lidia es importante por su relevancia en los festejos taurinos, para ello se debe procurar conservar y mejorar la bravura del ganado con la ayuda de técnicas modernas en reproducción eficazmente contrastadas en otras razas.

Desde hace algo más de 20 años, se han buscando medios que permitan mantener la diversidad biológica y que impidan la pérdida de especies de alto valor comercial o genético, por

ello el concepto “*Banco genético*” ha adquirido gran aceptación (Leibo y Songsasen, 2002). Recuperar y criopreservar espermatozoides tomados de epidídimo constituye una manera útil de rescatar el germoplasma de especímenes que estén en peligro de extinción, o que hayan muerto por causas naturales o accidentes (Brooke, 2003).

Por otro lado, es importante establecer un método que permita recolectar espermatozoides de sementales reproductores que hayan muerto repentinamente, de manera tal, que pueda obte-

nerse descendencia de esos toros, mediante la inseminación artificial o la fertilización *in vitro* (Barrios, 2002). Así que podría implementarse la recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo para propagar la calidad genética de toros *postmortem*, puesto que los espermatozoides que se encuentran allí tienen capacidad fecundante (Barrios 2002; Soler *et al.*, 2005).

El sitio principal de almacenamiento de espermatozoides en el tracto reproductivo masculino es la porción caudal o cola del epidídimo. Esta parte de la zona tiene una luz relativamente amplia en la que las altas concentraciones de espermatozoides se almacenan (Amann y Almgvist, 1962). Un trastorno funcional del epidídimo puede originar una composición anormal del plasma del epidídimo, disminución de motilidad de los espermatozoides anormales y cuadros clínicos de los espermatozoides (Galloway *et al.*, 1994; Oyeyemi y Ubiogoro, 2005). La maduración espermática se produce a su paso por el epidídimo, como se indica por el paso de la gota citoplasmática proximal, por debajo de la pieza intermedia y la gota citoplasmática distal antes de la eyaculación. Espermatozoides eliminados de la cola del epidídimo fueron de 2 a 10 veces más fértiles que los espermatozoides de la cápsula al parecer debido a anomalías en la motilidad de los espermatozoides de la cabeza del epidídimo (Cole y Cupps, 1977).

Teniendo en cuenta la importancia de la recuperación de espermatozoides que se perderían por la muerte de los animales, el objetivo del presente trabajo fue estudiar las características morfológicas y funcionales de espermatozoides de toros lidiados recuperados de epidídimos refrigerados a 5° C durante las 12 horas *postmortem*, basados en la edad, el peso, la circunferencia escrotal y sus variables espermáticas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente trabajo se utilizaron un total de 12 pares de testículos de toros de lidia recogidos en el desolladero de la Plaza de Toros de

Alicante. Los animales procedían de las ganaderías 1 (Valdefresno) y 2 (Garcigrande) encaste Domecq. El trabajo se realizó en dos fases. La fase inicial consistió en la medición de circunferencia escrotal, recogida de los testículos, refrigeración de los mismos en un recipiente isoterma a una temperatura de 5° C y transporte al laboratorio en un plazo máximo de una hora desde el sacrificio de los animales. La segunda fase (12 horas *postmortem*) se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de Murcia en el que se hicieron las valoraciones y contrastaciones que a continuación se detallan.

Para la obtención de espermatozoides epididimarios, una vez en el laboratorio, se separaron los testículos de los epidídimos y se lavaron con solución salina. Se realizó una disección de la cola del epidídimo, eliminando la túnica albugínea, dejando de este modo una porción libre del conducto deferente recto. Posteriormente, se obtuvo la secreción del mismo introduciendo un introcan® de 0,7 x 19 mm (Certo, Braun, Alemania) acoplado a una jeringuilla de 5 ml, introduciendo aire al tubo seminífero para ejercer presión, y de este modo recolectar el fluido luminal en un tubo de 5 ml, se procedió a realizar el cálculo de la concentración de espermatozoides de la muestra con la ayuda de un espectrofotómetro (Spermacue, Minitube). Dado que la concentración de espermatozoides en el epidídimo es elevada y se hace difícil el conteo y su manipulación, se realizó una dilución 1:2 con Steridyl® (Minitube) antes de comenzar los análisis espermáticos.

La motilidad individual se observó al microscopio a 100 aumentos, de forma subjetiva, depositando una gota plana sobre un porta y cubreobjetos atemperados valorando el movimiento en términos de porcentaje. El procedimiento con la tinción convencional de eosina nigrosina, se preparó como describen Tamuli y Watson (1994), realizando un frotis sobre un portaobjeto atemperado a 37°C; así el por-

centaje de vivos y muertos se observaron bajo microscopía de campo claro a 400 aumentos al menos 200 células, diferenciando aquellas que estaban parcial o totalmente teñidas de las que no habían permitido el paso del colorante, el resultado se expresó como el porcentaje de espermatozoides no teñidos los cuales fueron considerados como vivos (Soler *et al.*, 2005). Para el estudio de la morfología, se fijó una muestra de semen en solución salina formolada al 0,3% y se valoró en un microscopio de contraste de fases (Leica® modelo DMR, EE.UU.) con objetivo de inmersión (100X), los espermatozoides fueron clasificados en: normales, colas en látigo, colas en ovillo, gotas citoplasmáticas proximales y distales.

Los resultados se expresaron como porcentaje de células normales y anormales. Para determinar el estado de los acrosomas se utilizó la misma muestra fijada observando un mínimo de 200 espermatozoides. Se clasificaron como acrosomas normales aquellos que presentaban espermatozoides con bordes apicales bien definidos y nítidos en forma de semiluna oscura (Pursel y Johnson, 1974). Los resultados se expresaron en porcentaje de acrosomas normales.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa estadístico SAS 9.2, se tuvieron en cuenta las dos fuentes de variación y su propia interacción en cada uno de los parámetros (ganadería, testículo), la información de cada variable analizada se expresó como media  $\pm$  error estándar de la media. En los casos en donde la información obtenida correspondía a porcentajes, éstos fueron transformados según el modelo binomial de parámetros. En todos los análisis estadísticos se utilizó el modelo lineal general. Todas las experiencias fueron analizadas por ANOVA de una vía, excepto en aquellas en donde se evaluaron dos factores (ganadería, testículo), para lo cual se utilizó un ANOVA de dos vías. Cuando el ANOVA señaló efecto significativo, los valores fueron comparados por una prueba de comparación de medias de Tukey; finalmente se realizó

la prueba de Pearson para establecer la correlación entre las variables medidas.

## RESULTADOS

Los resultados del presente estudio se establecen sobre un número de 12 animales pertenecientes a 2 ganaderías que son similares en edad y peso (de acuerdo con el reglamento taurino); se evaluaron y analizaron estadísticamente con base en las variables edad, peso, circunferencia escrotal, peso testicular, longitud testicular, volumen seminal y concentración espermática. Posteriormente se valoró su correlación.

De acuerdo con el análisis de varianza no hubo diferencia significativa entre la edad de los animales (44 a 56 meses) para ninguna de las dos variables.

En la **Tabla 1**, se muestra el promedio, el error estándar de las medias y el nivel de significancia de peso animal entre las dos ganaderías, con casi un 33% de diferencia entre sí.

La correlación de la variable peso animal con la circunferencia escrotal, peso testicular y volumen de semen muestran diferencias altamente significativas ( $p < 0,0001$ ) (**Tabla 1**). Para la circunferencia escrotal el análisis de varianza presenta diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) entre ganaderías, pero no entre testículos (**Tabla 1**).

El promedio de las medias de peso testicular entre las dos ganaderías, es de casi 28% entre sí, pero no entre testículos (**Tabla 1**).

La variable peso testicular tiene coeficientes de correlación altamente significativas ( $p < 0,001$ ), con peso, circunferencia escrotal y volumen seminal (**Tabla 1**). También se observa que a mayor peso se produce una leve disminución de las células anormales.

Para la variable volumen seminal, no hubo diferencias significativas en el análisis de varianza, medias de cuadrados mínimos (Turkey), aunque existe una significativa correlación con el peso, la circunferencia escrotal y el peso testicular (**Tabla 1**). Además se puede ver que a

Tabla 1: Comparación de las características espermáticas entre ambas ganaderías

Variables		Ganadería 1	Ganadería 2
Edad (meses)		51,83 ± 3,92	51,17 ± 4,45
Peso (Kg.) <i>W</i>		467,33 ± 17,89*	500,33 ± 16,23*
Circunferencia escrotal (cm) <i>CE</i>		33,5 ± 0,55**	36,5 ± 1,52**
Peso del testículo (gs) <i>PT</i>	<i>derecho</i>	295,5 ± 4,56***	323,17 ± 14,93***
	<i>izquierdo</i>	293,50 ± 4,41***	321,12 ± 14,93***
Volumen (ml) <i>V</i>	<i>derecho</i>	0,32 ± 0,075	0,38 ± 0,075
	<i>izquierdo</i>	0,35 ± 0,055	0,35 ± 0,140
C. espermática x 10 <sup>6</sup> <i>Ce</i>	<i>derecho</i>	412,5 ± 33,40	429,17 ± 29,76
	<i>izquierdo</i>	412,5 ± 41,75	428,70 ± 27,43
Motilidad Ind. (%) <i>MI</i>	<i>derecho</i>	51,5 ± 2,50	53,17 ± 3,31
	<i>izquierdo</i>	50,70 ± 2,73	51,83 ± 3,49
Vivos / muertos (%) <i>VM</i>	<i>derecho</i>	77,17 ± 6,05	77,83 ± 3,87
	<i>izquierdo</i>	73,58 ± 6,25	77,00 ± 4,60
Células normales <i>Cn</i>	<i>derecho</i>	69,33 ± 5,96	76,17 ± 5,78
	<i>izquierdo</i>	68,16 ± 4,92	73,67 ± 5,85
Células anormales <i>Ca</i>	<i>derecho</i>	29,50 ± 5,96	23,83 ± 5,78
	<i>izquierdo</i>	31,83 ± 4,92	26,33 ± 5,85
Acrosoma normal (%) <i>An</i>	<i>derecho</i>	77,33 ± 4,32	79,33 ± 3,56
	<i>izquierdo</i>	76,50 ± 4,85	78,33 ± 3,88

Diferencias significativas entre variables \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,0001$ ) \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

mayor volumen seminal disminuye el % de células anormales.

Para las demás variables evaluadas como la concentración espermática, la motilidad individual, vivos y muertos, morfoanomalías y acrosomas normales, no se determinaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Como dato adicional, en todos los testículos se evaluaron las medidas de circunferencia escrotal, longitud y peso testicular; los testículos seleccionados para el presente estudio ( $n=24$ ) tuvieron unos valores que se corresponden con los promedios para machos de la raza cebú (Sudheer, 2000; Chacón *et al.*, 2002).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio las características morfológicas y funcionales de espermatozoides de toros lidiados recuperados de epidídimos refrigerados a 5°C durante las 12 horas *postmortem*, están en concordancia con las de otros estudios realizados en bovino (Melo *et al.*, 2008), por lo que es viable realizar criopreservación de espermatozoides del epidídimo a partir de este material con el protocolo descrito, lo que supone una técnica prometedora para conservar los recursos genéticos ya demostrados en diferentes especies animales (Kikuchi *et al.*, 1998) y que

en el toro de lidia cobra un interés en el caso de algunos animales de alto valor genético que hayan muerto repentinamente o en las plazas de toros sin la posibilidad de ser indultados.

Las diferencias significativas en las variables encontradas fueron siempre entre ambas ganaderías y no entre animales, por lo que hay que pensar, que en principio, existe bastante homogeneidad para los parámetros reproductivos entre los animales de una misma ganadería, ya que genéticamente es una población muy homogénea y que en ocasiones lucha para evitar la consanguinidad (Cañón, 2005).

En este trabajo la correlación entre los diferentes parámetros testiculares es un hecho, así la correlación de la variable peso animal con la circunferencia escrotal, peso testicular y volumen de semen muestran diferencias altamente significativas. Estas correlaciones nos están indicando fundamentalmente cómo el tamaño del animal repercute en los parámetros morfológicos testiculares, al igual que ha sido descrita para la especie bovina (Sudheer, 2000).

Nuestras observaciones sobre la edad con respecto al número de células normales y acrosomas normales coinciden con las aportadas por Vejarano *et al.* (2005), donde no observaron diferencia significativa ( $p > 0,01$ ) de la morfología espermática entre los diferentes grupos de edad, lo que sugiere que la morfología espermática de un eyaculado es igual en toros de diferentes edades y que la edad no marca diferencias significativas sobre dicha característica, resultados similares fueron encontrados por Sabogal (2000).

Los coeficientes de correlación de *Pearson* obtenidos, muestran un alto nivel de significancia de la circunferencia escrotal, que se corresponde con Pinho *et al.*, (2001), que observaron en toros cebú que a mayor circunferencia escrotal, mayor volumen y concentración espermática. Hallazgo que puede estar asociado con un mayor volumen de túbulos seminíferos que son las unidades morfológicas responsables de la producción espermática y que representan

un 75% del volumen testicular (Fonseca *et al.*, 1997).

## CONCLUSIONES

Los espermatozoides de toros lidiados, recuperados de epidídimos refrigerados a 5°C durante las 12 horas *postmortem*, presentan características morfológicas que permiten su criopreservación. Las diferencias significativas establecidas entre los parámetros testiculares estudiados, peso, circunferencia escrotal y peso testicular aparecen entre animales de diferentes corridas y no entre los de la misma. Existe una correlación altamente significativa entre los diferentes parámetros testiculares, peso del animal, circunferencia escrotal y peso testicular, aunque son pocos los animales estudiados y estudios posteriores con mayor número de animales deben ser realizados.

## BIBLIOGRAFÍA

- AMANN R.P., ALMGUIST J.O. 1962. Reproductive capacity of dairy bull. Morphology of epididymal sperm. *J Dair Sci* 45: 15-6.
- BARRIOS A.D. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. pp. 1-14. Valera. Venezuela.
- BROOKE F. 2003. Cryopreservation by pellet freezing of epididymal and ejaculated spermatozoa from male dogs. Tesis Doctoral. Louisiana State University. USA.
- CAÑÓN J. 2005. Análisis de la estructura genética de la raza de lidia utilizando marcadores de ADN. V Congreso Mundial de Veterinaria Taurina. Valladolid. España.
- CHACÓN J., PÉREZ E., RODRÍGUEZ M. H. 2002. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. *Theriogenol* 58 (1): 41-50.

- COLE H., CUPPS P. T. 1977. Reproduction in domestic animals. 3<sup>rd</sup>. pp. 65. Ed. Academic Press, New York. USA.
- FONSECA V.O., SANTOS N.R., MALINSKI P.R. 1997. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfológicas do sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 21 (2): 36-39.
- GALLOWAY S.M., AARDEMA M.J., ISHIDATE M. IVETT J.L., KIRLAND D.J., MORITA T., MOSESSO P., SOFUNDI T. 1994. Report from working group on in vitro test for chromosomal aberrations. *Mutation research* 312:241-261.
- LEIBO S.P., SONGSASEN N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenol* 57: 303-326.
- KIKUCHI K., NAGAI T, KASHIWAZAKI N., IKEDA H., NOGUCHI J., SHIMADA A., SOLOY E., KANEKO H.. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenol* 50: 615-623.
- MELO C.M., PAPA F.O., FIORATTI E.G., VILLAVERDE A.I, AVANZI B.R., MONTEIRO G. 2008. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reprod Scien* 107(3-4): 331-331.
- OYEYEMI M.O., UBIOGORO O. 2005. Spermogram and Morphological characteristics in testicular and epididymal spermatozoa of large White Boar in Nigeria. *Int J Morphol* 23(3): 235-9.
- PINHO, T. G., NOGUEIRA, L. A. G., PINTO, P. A., ZAMBORLINI, L., GILARDI, S., CALDAS, M., SOUZA, R. M. 2001. Características seminais de touros jovens nelore (*Bos taurus indicus*) de acordo com a biometria e morfologia testicular. *Revista Brasileira Reprodução Animal* 25 (2): 187-189.
- PURSEL G., JOHNSON A. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Reprod Develop* 26: 184-198.
- SAGOBAL R. 2000. Caracterización del Material Seminal Bovino Importado a Colombia, I.C.A. Sugerencia de Prevención y Control División de Insumos Pecuarios. Santa Fe de Bogotá. Colombia.
- SOLER A.J., ESTESO M.C., FERNÁNDEZ-SANTOS M.R., GARDE J.J. 2005. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 64 (7): 1503-1517.
- SUDHEER S. 2000. Relationship between testicular size and seminal attributes in crossbred bulls. *Indian J Anim Res* 34(2): 159-160.
- TAMULI M.K., WATSON P.F. 1994. Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. *Vet Rec.* 13 (7): 160-162.
- VEJARANO O.A., SANABRIA R.D., TRUJILLO G.A. 2005. Diagnóstico de la capacidad reproductiva de toros en ganaderías de tres municipios del Alto Magdalena. *MVZ-Córdoba* 10 (2) 648-662.