

# CAPÍTULO XV

## EVALUACIÓN SEMINAL COMPARATIVA PRE Y POSTCONGELACIÓN EN MACHOS BOVINOS

- I. INTRODUCCIÓN
- II. CARACTERÍSTICAS Y PARÁMETROS UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE SEMEN
- III. EVALUACIÓN DE RUTINA EN EL CENTRO DE CONGELACIÓN DE SEMEN e I.A.
  1. Evaluación en Semen fresco.  
Características macroscópicas.
  2. Características Microscópicas
- IV. CÁLCULO DEL NÚMERO DE DOSIS RECOMENDADAS PARA DILUIR Y CONGELAR
- V. EVALUACIÓN DE SEMEN CONGELADO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN
- VI. CONCLUSIÓN
- VII. LITERATURA CITADA



## **I. INTRODUCCIÓN**

La evaluación seminal en toros en especial en aquellos seleccionados como reproductores es fundamental para evitar problemas de sub-fertilidad e infertilidad en el rebaño. Existen muchos factores que pueden afectar la calidad del semen de esos reproductores como lo son los factores medioambientales, el estado nutricional, las condiciones sanitarias y el manejo. Se utilizan diferentes métodos de uso rutinario para evaluar la calidad seminal en los Centros de Inseminación Artificial (I.A.) o en los Laboratorios de investigación en Reproducción Animal. Los métodos deben tener gran precisión y deben ser además sencillos, económicos y rápidos, de manera que permitan detectar a tiempo cualquier cambio en la calidad del semen de los reproductores que pudieran afectar la capacidad fértil del mismo.

Cuando se evalúa semen, se está evaluando calidad seminal. La calidad seminal viene dada por la comparación de los parámetros obtenidos al evaluar el semen de un toro con los valores que son considerados como normales para un toro reproductor adulto. Los valores normales o estándares del semen fresco se han establecido por el estudio, a lo largo de muchos años, de un número de eyaculados, del orden de cientos de miles; esos valores normales están directamente relacionados con la fertilidad. El macho en monta natural significa más o menos la mitad del rebaño pero en la I.A. constituyen una parte muy significativa en muchos rebaños, de ahí la importancia de seleccionar los machos superiores no sólo de valor genético y buena libido sino que también por mostrar semen de elevada calidad y fertilidad.

La correcta ejecución del método para analizar el semen requiere de un profesional que esté debidamente entrenado y que haya adquirido la experiencia y los criterios para evaluar cada uno de los parámetros que se determinan; de esta manera el análisis es más rápido y confiable. Además, en la actualidad se han desarrollado una serie de ensayos bioquímicos que sirven de apoyo y que le ofrecen aún más bases científicas al método de análisis del semen necesario para establecer el potencial fértil del espermatozoide. Finalmente es recomendable establecer controles de calidad para reducir los errores inter-observadores e incrementar la repetibilidad de los resultados.

## **II. CARACTERÍSTICAS Y PARÁMETROS UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE SEMEN**

A continuación se muestran en el cuadro 1 las características y los parámetros que se evalúan en el análisis del semen que se realiza en los Centros de Congelación de semen e I.A. y en los Laboratorios de Investigación en Reproducción Animal.

### Cuadro 1

#### Evaluación de rutina del semen fresco en el Centro de Congelación de Semen e I.A. y Laboratorio de investigación en reproducción animal

Características Macroscópicas	Volumen (ml) Color, olor y aspecto
Características Microscópicas	Motilidad masal(1-4) Motilidad individual (%) Vitalidad (%) y Morfología (%) Concentración espermática (# esperm/ml).
Características Físico-Químicas	pH

Cuando se congela el semen que va a ser utilizado en I.A., este sufre un deterioro en la membrana plasmática y en su acrosoma a causa del proceso de congelación. Esto se ve reflejado en una disminución en la motilidad individual (MI) cuando se evalúa el semen post-congelación. Por tal motivo, como se señala en el cuadro 2, es necesario el examen de rutina de la MI post-congelación, justo después de terminar el proceso de congelación y 7 a 14 días post-congelación. La MI post-congelación tiene una disminución en promedio de un 30 a 40% en relación a la MI en el semen fresco; sin embargo hay toros cuyo semen se ve menos afectado en su MI post-congelación. Esto es debido a que se ha determinado que la susceptibilidad de la célula al enfriamiento está relacionada con la composición lipídica de la membrana del espermatozoide. Los avances en el desarrollo de técnicas han permitido evaluar la composición lipídica de la membrana espermática y comprobar como se afecta tanto por el proceso de congelación (consecuencias físicas y químicas) como por el manejo del semen.

### Cuadro 2

#### Evaluación del semen congelado en el Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal

Características Microscópicas (examen de rutina).	Motilidad individual (%) Morfología espermática (%)
Examen Bioquímico	<u>Espermatozoide</u> : Acrosina Actividad de Aspartato aminotransferasa (AAT) Fosfolípidos de la membrana Estabilidad de la cromatina <u>Plasma seminal</u> : Iones y marcadores bioquímicos
Examen Microbiológico	Bacterias y virus
Examen Biológico	Fecundación <i>in vitro</i>

Para cualquiera de los métodos utilizados en la obtención del semen, existen algunas recomendaciones para la toma de la muestra y el examen de la misma [8], las cuales tienen como objetivo la estandarización en la obtención de la muestra y

la evaluación de una muestra realmente representativa de cada toro. Entre las recomendaciones que inciden en la representatividad de la misma se señalan:

- Cada eyaculado se debe obtener sin pérdidas ni contaminaciones
- La supervivencia de los espermatozoides no debe estar afectada
- Los valores obtenidos para los parámetros seminales con cualquier método que se elija, deben ser similares o lo más cercanos que los indicados como normales para el servicio natural
- La sanidad y la libido del animal deben ser controladas
- El método de recolección debe ser sencillo.

A continuación se explica de manera general cuales son y como se evalúan cada uno de los parámetros seminales, dando a conocer sus valores normales para establecer los criterios de calidad seminal.

### **III. EVALUACIÓN DE RUTINA EN EL CENTRO DE CONGELACIÓN DE SEMEN e I.A.**

#### **1. Evaluación en Semen fresco. Características Macroscópicas**

Esta evaluación se realiza inmediatamente después de cada recolección. De esta evaluación se van a obtener los valores que van a determinar el número de dosis a congelar. Los valores más importantes que determinan la producción de dosis de inseminación son el volumen, la motilidad individual (MI), la concentración espermática y la morfología.

Primero se mide el volumen en el tubo de colección, en una probeta graduada o por aspiración de toda la muestra en una pipeta graduada. Los materiales deben estar debidamente esterilizados, en especial si la muestra se va a utilizar para congelación o cultivo. La medida se expresa en mililitros (ml). Para el volumen existen algunos valores de referencia tanto para el semen obtenido con vagina artificial como para las recolecciones con electroeyaculador; se ha señalado basándose en experiencias con vagina artificial [8] que el eyaculado de un toro joven tiene en promedio un volumen mayor de 2 ml, mientras que un toro adulto tiene un volumen mayor de 4 ml. Las pruebas con electroeyaculador indican como valores normales de 5 a 7 ml o volúmenes superiores.

La aparición de colores u olores anormales en el eyaculado puede ser debida a alteraciones patológicas del aparato genital o a la mezcla del semen con orina durante la eyaculación, por eso es recomendable anotar el color y el olor del eyaculado. En el toro el color del eyaculado depende de su contenido de riboflavina, siendo normalmente blanquecino, marfil hasta amarillento. Una coloración rojiza indica mezcla con sangre fresca; un color pardo señala la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica sucio. Los eyaculados con muy pocos espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa. El pus en el eyaculado se reconoce frecuentemente por los flóculos (piospermia) [8].

Las muestras de semen recogidas higiénicamente de toros sanos y fértiles tienen un débil olor aromático como a yema de huevo [8]. Son motivo de rechazo el olor urinoso, pútrido o el olor específico del animal, que se produce luego de contaminación (por ejemplo, materia fecal) [8].

## 2. Características Microscópicas

La evaluación microscópica debe incluir observaciones como aglutinación espermática, el contenido de células extrañas y otros agregados. Para ello se requiere un microscopio con contraste de fase, una platina termorregulable para mantener el portaobjeto a 37°C, pipetas de vidrio, portaobjetos y cubreobjetos.

a. **Motilidad.** La evaluación de la motilidad indica la capacidad de movimiento de los espermatozoides. En el caso del toro por ser un eyaculado generalmente muy concentrado se observa primero una gota sin cubrir a bajo aumento, en donde se ve un movimiento en masa en forma de ondas el cual se denomina motilidad masal (MM). En otras especies fuera de los rumiantes no se observa este movimiento, salvo algunas excepciones en donde la concentración espermática puede ser tan elevada como en los bovinos. Para evaluar la MM se toma una gota de semen (gota de semen entero, 10 a 20  $\mu$ l) con una pipeta, se coloca sobre un portaobjeto a 37°C y se observa sin necesidad de cubreobjeto en campo claro a un aumento de 100X. El movimiento en masa depende de tres factores: concentración espermática, porcentaje de espermatozoides móviles en progresión lineal y de la velocidad de progresión de los espermatozoides [1].

En Venezuela se han tomado como referencia para los valores de Motilidad Masal los criterios establecidos por la Sociedad Americana de Teriogenología [6]. Esos criterios variables entre 1 y 4 se muestran en el siguiente cuadro modificado [6]:

**Cuadro 3**  
**Clasificación de la motilidad masal en eyaculados bovinos**

Valor	Clasificación	Descripción
1	Pobre	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil
2	Aceptable	Ondas ligeras con movimientos apenas perceptible
3	Bueno	Ondas aparentes. Remolinos con movimientos moderado
4	Muy Bueno	Ondas oscuras con movimientos rápido

b. **Motilidad Individual Progresiva.** La motilidad individual (MI) de una muestra de semen se expresa como el porcentaje (%) de células móviles bajo un campo microscópico. Un espermatozoide de motilidad progresiva es aquel que se mueve de un punto a otro en una línea más o menos recta [2]. Gran parte de los espermatozoides podrán tener otros tipos de motilidad; esto incluye movimientos circulares así como inversos, debido a anormalidades en la cola y a un movimiento de vibración o de oscilación, a menudo asociado al envejecimiento. La motilidad progresiva es la prueba de calidad individual más importante, debido a que la fertilidad está altamente correlacionada con el número de espermatozoides móviles inseminados [2].

El examen de la motilidad debe hacerse con la ayuda de un microscopio de contraste de fase con un aumento de entre 200X a 400X y a una temperatura de 37°C, la cual puede mantenerse constante con una platina calentadora termorregulable adherida al microscopio. Esta valoración es cuanti-cualitativa, ya que se evalúa la tasa de espermatozoides en movimiento de 0 a 100% y la calidad según el tipo de movimiento (progresión lineal, progresión no lineal, no progresivo e inmóviles).

El semen de toro es demasiado concentrado como para hacer una determinación exacta de la motilidad individual sin diluir el semen. Un volumen pequeño de la muestra se debe diluir con una solución isotónica (con la misma concentración de iones libres que en el semen) para poder observar individualmente a los espermatozoides. Se utiliza NaCl al 0,9% o citrato de sodio al 2,9%. Luego se coloca una gota diluida (10 a 12  $\mu$ l) en un portaobjeto y se cubre para observar al microscopio. En toros esto requiere de una dilución de 1 en 100 [2]. En relación con la MI en semen congelado, no es necesario diluir la muestra, y cada dosis congelada a evaluar se descongela sumergiéndola en un baño a 37°C por 30 segundos; luego se toman 10 o 12  $\mu$ l con una micropipeta, se depositan sobre un portaobjeto, se cubre con el cubreobjeto y se observa a 100X y 400X. De la observación se anota el porcentaje de espermatozoides móviles en un campo. En la actualidad existen sistemas de análisis basados en las medidas cuantitativas hechas directamente sobre las imágenes de vídeo, gracias a la incorporación de una cámara de vídeo al microscopio, la cual está conectada a una computadora que realiza el análisis. Los sistemas más usados son el sistema CellSoft (USA) en humanos y Hamilton (USA) para bovinos [3]. Las características de la motilidad del espermatozoide pueden ser analizadas directamente en pocos minutos o sobre observaciones de imágenes pre-grabadas. El equipo ofrece parámetros de medidas muy importantes de la concentración espermática, porcentaje de motilidad espermática, velocidad y linealidad de la progresión espermática, etc. Se puede encontrar una guía en el siguiente cuadro que propone un criterio para evaluar la motilidad individual si no se cuenta con sistemas automáticos de evaluación [6]

**Cuadro 4**  
**Referencias en la evaluación de la motilidad espermática individual**  
**sugeridos por la Sociedad Americana de Teriogenología (en porcentaje)**

Valor (%)	Clasificación	Descripción
< 50	Pobre	Muy lento y errático
60-70	Aceptable	Lineal lento y generalizado
70-80	Bueno	Lineal moderadamente rápido
80-100	Muy Bueno	Lineal rápido

c. Vitalidad. Existe un conjunto de técnicas que permiten una coloración selectiva de espermatozoides vivos y muertos, como consecuencia de los cambios bioquímicos que se producen tras la muerte (acción cromocitológica). Los primeros ensayos al efecto fueron llevados a cabo en el año 1942 por Lasley y colaboradores [cit 7] quienes emplearon como colorante una mezcla de eosina y una

solución de opal-blue en un medio tamponado a base de fosfatos y perfectamente isotónico, pudiendo demostrar que los espermatozoides muertos aparecían coloreados, mientras que los vivos no se teñían [7].

En esta técnica la eosina constituye el colorante vital, mientras que el opal-blue es el colorante de fondo; en definitiva, los espermatozoides muertos aparecen teñidos en rosado por la eosina y los vivos no se colorean. Otros sustitutos eficaces de la eosina como colorantes vitales son el rojo de bengala, la eritrosina, el verde cresol o el azul de bromofenol con el que se ha tenido más claridad en la interpretación; mientras que, en todo caso, como colorantes de fondo se prefiere el azul de anilina o la nigrosina. Con el colorante eosina-nigrosina los espermatozoides muertos aparecen teñido en rojo o en rosa, mientras que los vivos quedan sin teñir [7].

En todo caso se trata de una tinción que requiere cierta experiencia y entrenamiento para su interpretación ya que puede haber matices de tonalidades intermedias, que pueden crear confusión. De algunas experiencias previas se puede aconsejar que cuando las preparaciones se tratan primeramente con cloramina al 1% (antes de la tinción) los resultados son más específicos [7].

d. Morfología espermática. El sistema de clasificación que ha sido aceptado ampliamente en bovinos es el de las atípicas o defectos espermáticos primarios y secundarios; sin embargo, este sistema ha tenido diferentes significados e interpretaciones por los evaluadores. Por definición, un defecto primario es el que se origina dentro del testículo durante la espermatogénesis; un defecto secundario es un defecto que se origina dentro del epidídimo [1]. Generalmente se le da mayor importancia a los defectos primarios. Es necesario señalar que la definición por defecto primario y secundario denota el origen y no la severidad del defecto. Siendo conocido que condiciones las adversas del medio que causan ambos tipos de defectos pueden afectar las funciones del epidídimo y la espermatogénesis simultáneamente, tanto los defectos primarios como los secundarios son igualmente importantes como indicadores de un disturbio de la función testicular; por eso en la actualidad se da igual importancia tanto a unos u otros defectos. Se ha demostrado la correlación entre defectos morfológicos del espermatozoide e infertilidad y se ha establecido 30% como un porcentaje aceptable o máximo permitido de atípicas, es decir, se acepta un 70% de espermatozoides normales. Se ha establecido un límite de defectos de la cabeza de un 15 a 20%, mientras que defectos del acrosoma y defectos de la cola se toleran en un 25% [1].

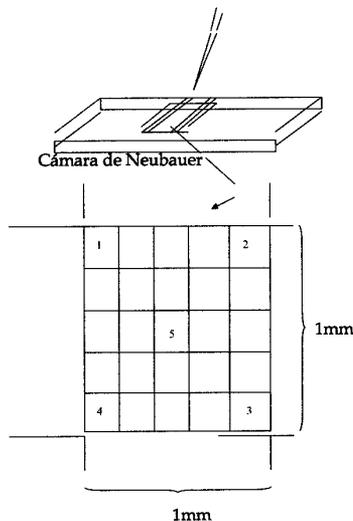
El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación por contener las enzimas necesarias para la penetración del cúmulo oophorus y de la zona pelúcida. La reacción acrosomal previa a la fecundación produce puntos de fusión de la membrana apical celular con la membrana externa del acrosoma y forma vesículas para que el contenido enzimático pueda ser liberado ejerciendo su actividad sobre el ovocito. Las alteraciones del acrosoma o del proceso de capacitación inhiben la fecundación de la célula espermática, mientras que el proceso de congelación de semen produce daños en la membrana del espermatozoide y del acrosoma a pesar de la presencia de un agente crioprotector en el diluyente de congelación. Este agente reduce los daños al acrosoma pero siempre se espera una reducción en la MI como producto del deterioro de la membrana y del acrosoma. Por eso se re-

comienda a manera de control de calidad de todo el proceso de congelación evaluar la integridad del acrosoma antes y después de congelado el semen, es decir, en semen fresco y en semen post-congelación (evaluación mensual).

La integridad del acrosoma se puede evaluar con diferentes métodos microscópicos y utilizando diferentes técnicas de tinción como Giemsa, Naphtol amarillo y eritrocina B. Sin embargo, el método más práctico y rutinario es la fijación en glutaraldehído y observación en un microscopio de contraste de fase. El aumento de espermatozoides con daño en el acrosoma pre-congelación es una evidencia de baja calidad seminal y puede incluso recomendarse el descarte de esa muestra para congelación. El aumento excesivo de acrosomas dañados post-congelación pudiera indicar algún problema en el proceso de congelación o estar relacionada con una composición lipídica de la membrana anormal que incide en una mayor susceptibilidad del espermatozoide al enfriamiento.

e. Concentración espermática. La concentración de espermatozoides se expresa como el número de espermatozoides por ml. La determinación de la concentración zoospérmica se lleva a cabo en forma simple mediante métodos semejantes al recuento de glóbulos rojos realizado en hematología.

Recuento directo de células espermáticas utilizando el hemocitómetro. El hemocitómetro (cámara de Neubauer) fue diseñado para contar eritrocitos (Figura 1). Consiste en una lámina especial que tiene 2 cámaras de conteo. Las cámaras de conteo tienen 0,1 mm de profundidad y un área graduada en el fondo de la cámara de 1 mm<sup>2</sup>. Este cuadro central se divide en 25 cuadros más pequeños. Al conocerse la profundidad y el área es posible determinar el número de espermatozoides en un volumen dado. Por lo general, se utiliza un factor de dilución de 1 en 200 en el caso del semen del toro [2].



**Figura 1.** Cámara de Neubauer.

La solución utilizada para diluir el semen debe inmovilizar a los espermatozoides para que se pueda llevar a cabo el recuento; normalmente se utiliza NaCl al 3% (solución hipertónica) o solución salina formolada al 3 por mil. De esa dilución se toman unos 20  $\mu$ l y se depositan en el hemocitómetro.

Para el cálculo de la concentración espermática se cuenta el número de espermatozoides en cinco de los 25 cuadraditos del cuadrado central (1%) marcados en la figura anterior entre 1 y 5 (en las 4 esquinas y en el centro). Este resultado se multiplica por 10,000 como resultado de la dilución (1/200), la profundidad de la cámara, para llevarlo a medida cúbica (1/10) y 1/5 de los pequeños cuadrados contados de los 25 que hacían el milímetro cuadrado. De esa forma se obtiene el número de espermatozoides por  $\text{mm}^3$ ; si el resultado se multiplica por 1.000 y se transforma en una medida volumétrica la concentración queda expresada en cantidad de espermatozoides por ml (# espermatozoides/ml).

f. Características fisico-químicas. El test de pH generalmente se incluye en los análisis de rutina como un parámetro orientador. El pH viene dado por las secreciones ácidas provenientes de la próstata y las secreciones alcalinas de las vesículas seminales. El pH en el semen del toro oscila como valor normal entre 6.6 y 6.9 hasta 7.0. Si el pH excede de 7 se puede sospechar de algún tipo de infección y probablemente en ese caso disminuya la secreción de productos ácidos de la próstata, tales como el ácido cítrico. Se pueden medir valores de pH anormales en el caso de eyaculación incompleta. Valores de pH extremadamente ácidos (>6.5) se encuentran en casos de agenesia o oclusión de las glándulas vesiculares.

#### IV. CÁLCULO DEL NÚMERO DE DOSIS RECOMENDADAS PARA DILUIR Y CONGELAR

Una vez terminado el análisis básico del laboratorio, se procede a la recomendación del número de dosis que pueden ser diluidas y posteriormente congeladas:

$$\text{Número de dosis} = \frac{(\text{Volumen en ml}) \times (\text{Concentración espermática (spz/ml)}) \times (\text{MI})}{\text{Millones de espermatozoides por dosis } (\pm 30 \times 10^6)}$$

#### V. EVALUACIÓN DE SEMEN CONGELADO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN

Entre las características microscópicas en el examen de rutina post-congelación podemos señalar:

##### 1. Motilidad Individual

La motilidad de una muestra de semen recientemente obtenida no es una buena predicción de su fertilidad ni de la capacidad de los espermatozoides para sobrevivir al proceso de congelación. La evaluación de la MI en semen fresco es importante para la identificación de eyaculados que pudieran estar por debajo del

valor normal (<50% de MI, cuadro 4) por lo que deberían desecharse aquellas muestras. Esto es, si la MI es muy baja en semen fresco, esta tenderá a disminuir aún más en la evaluación post-congelación y disminuirá el número de dosis debido al proceso de congelación. El empleo de una coloración de células vivas y muertas para seleccionar las muestras no mejora las cosas en este aspecto pero ofrece una alternativa más objetiva además de la estimación de la MI.

La valoración exacta del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva después de la congelación es de gran importancia. Se ha demostrado que una fertilidad óptima se produce cuando el número de espermatozoides móviles en progresión post-congelación varía entre 5 a 15 millones por unidad o dosis dependiendo del nivel de fertilidad del toro [9]. Debido a que el semen de diferentes toros varía fuertemente en el porcentaje de células que sobreviven a la congelación, el número total de espermatozoides colocados en cada dosis puede ser diferente de un toro a otro. Si el carácter motilidad progresiva para el semen de un toro muy fértil es del 50% post-congelación, la concentración total de espermatozoides en cada dosis puede variar desde 10 a 20 millones. Por otra parte, si la MI tras la descongelación se halla normalmente alrededor del 25% en otro toro, la concentración total de espermatozoides por dosis deberá ser mayor. Conforme varía la MI tras la descongelación, la concentración total de espermatozoides por dosis debe ser ajustada.

## **2. Morfología espermática**

Los toros que van a utilizarse en I.A. deben producir semen que no contengan excesivo número de espermatozoides morfológicamente anormales. La vigilancia continua del semen de cada toro con recuentos morfológicos mensuales es recomendable.

La evaluación de la integridad del acrosoma antes y después del proceso de congelación es otro control útil, ya que a mayor número de acrosomas intactos post-congelación está directamente relacionado con capacidad fértil y mayores tasas de no-retorno.

## **3. Examen bioquímico de las células espermáticas**

Cuando existen problemas de fertilidad en un centro de I.A., o se requiere determinar con más exactitud la capacidad fecundante de un eyaculado, es posible realizar ciertas pruebas bioquímicas junto con los test de rutina, para determinar la calidad seminal, entre ellas la prueba de la actividad de acrosina.

a. Actividad de la acrosina. La acrosina es una enzima de características similares a la tripsina y se encuentra exclusivamente en la cabeza del espermatozoide, en el acrosoma. Esta enzima juega un papel esencial en la penetración del espermatozoide en el óvulo. La liberación de acrosina del espermatozoide después de un choque frío, al igual que ocurre en el caso de la aspartato aminotransferasa (AAT), indica el estado de permeabilidad de la membrana espermática en ese momento y consecuentemente el grado de deterioro de la misma producido por las agresiones físico-químicas a las que se la ha sometido previamente. Sin embargo, esta técnica no ha sido muy utilizada por laboriosa.

b. Composición fosfolipídica de la membrana. Se sabe que la susceptibilidad de la célula al enfriamiento está relacionada con la composición lipídica de la membrana del espermatozoide. Los espermatozoides de ciertas especies animales (como el toro, verraco y morueco), en cuya membrana la relación ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados es muy alta, son más sensibles al frío. La susceptibilidad al choque térmico se ha relacionado también con el contenido de colesterol/fosfolípidos de la membrana espermática.

c. Estado de condensación de la cromatina. La determinación del estado de condensación de la cromatina puede ser un parámetro fundamental para la determinación de la calidad seminal con semen crioconservado. Esto es debido a que las lesiones a nivel de la cromatina (del ADN del núcleo) pueden inducir un incremento de la mortalidad embrionaria, complementando de una forma eficaz los estudios sobre la integridad del acrosoma y membrana celular para establecer mejor correlación con la fertilidad.

El estado de la cromatina en el espermatozoide puede determinarse *in vitro* en base a su susceptibilidad a los factores de descondensación; estos compuestos rompen los enlaces o puentes disulfuro formando complejos con iones metálicos divalentes especialmente con el zinc, que estabiliza la cromatina espermática. La heparina es uno de los compuestos más importantes que da lugar a la descondensación de la cromatina *in vitro*. La descondensación de la cromatina se basa en la detección autorradiográfica del complejo ADN-proteína nuclear en el espermatozoide, usando Actinomicina tritiada. Los espermatozoides con un desarrollo normal mantienen una estructura de la cromatina resistente a la desnaturalización del ADN [5]. Si se evalúa el estado de condensación de la cromatina pre-congelación y post-congelación, se podrá observar como en el semen descongelado, la incorporación de actinomicina es mayor, es decir, hay una mayor tendencia a la descondensación, lo que se puede traducir en un menor desarrollo de los embriones de vacas inseminadas con semen descongelado que tenga un grado de descondensación alto. Esta prueba se puede utilizar cuando se observe una baja en la fertilidad o bajas tasas de no-retorno.

#### d. Plasma seminal.

Proteínas totales. El contenido en proteínas también parece incidir sobre la calidad del semen. La susceptibilidad al choque térmico frío aumenta en ausencia de secreciones de las vesículas seminales [4].

El Zinc. Los iones se encuentran en el plasma seminal en forma libre o combinada a proteínas. El Zinc parece influir sobre la calidad del semen o está relacionada con ella. El contenido de zinc disminuye a medida que la calidad seminal empeora. Su papel fisiológico y bioquímico no está muy claro, aunque se piensa que es importante en la estabilidad de la membrana, de la cromatina y de la MI.

### 4. Examen microbiológico

La contaminación del semen por la flora bacteriana bien sea del tipo sanitario o por deficiencias de la higiene, incide enormemente en la economía y en determinados aspectos de la reproducción de la hembra, como disminución de la fertilidad y aumento de la mortalidad embrionaria. Puesto que muchos microor-

ganismos no tienen su origen ni en los testículos ni en las glándulas accesorias, es muy importante seguir correctamente los procedimientos de recolección para minimizar el riesgo de contaminación del semen. Estos análisis se realizan por indicación del Médico Veterinario.

Es importante hacer un buen control microbiológico del semen ya que a veces pueden encontrarse altas concentraciones de bacterias, lo cual hace descender significativamente la capacidad de crioconservación y la fertilidad de ese semen. Los problemas de contaminación se resuelven mediante pruebas de sensibilidad de estos agentes frente a antibióticos, adicionándose a la dosis seminal para conseguir una buena inhibición del crecimiento bacteriano.

### 5. Examen biológico

Ya que la fecundación es una de las claves para determinar la fertilidad *in vivo* de un macho, el desarrollo de la técnica de fecundación *in vitro* (FIV) se ha convertido en un procedimiento eficaz para predecir la fertilidad *in vivo* de un macho. La FIV consiste básicamente en la exposición de oocitos maduros a espermatozoides capacitados de tal forma que la fecundación se produzca fuera del aparato genital de la hembra, o sea, *in vitro*, en un laboratorio especializado de investigación en biotecnología reproductiva. Los oocitos se pueden obtener a partir de ovarios de matadero por punción de folículos de 2 a 5 mm de diámetro, los cuales posteriormente se maduran *in vitro* en un medio especial de maduración, el cual generalmente es TCM-199 suplementado con piruvato de sodio, lactato de sodio, gentamicina y hepes. Algunos medios adicionan FSH (10 g/ml) además de 20% de suero de vaca en estro (que contiene LH y FSH).

La duración total del cultivo para madurar los oocitos es de 24 a 27 horas. Pasado ese tiempo, los oocitos son considerados maduros, cuando ellos responden a los siguientes criterios:

- Expansión de los cúmulos
- Aparición del primer glóbulo polar
- Aumento del espacio perivitelino y modificaciones citoplasmáticas: esclarecimiento periférico, condensación, etc

Tras la maduración, se ponen en contacto los oocitos con los espermatozoides capacitados (6 a 8 horas) y tras incubación se determina la tasa de penetración.

## VI. CONCLUSIÓN

Es posible señalar que en los últimos tiempos ha habido mayor interés en evaluar más rigurosamente el semen del macho reproductor. Esto debido a que se considera que el llamado análisis básico del semen no es suficiente para explicar la interacción del semen frente al proceso de congelación, frente al proceso de la capacitación, la fecundación *in vitro*, etc. Por tal motivo el análisis básico del semen se ha enriquecido con la incorporación de nuevas técnicas y equipos para determinar con mayor exactitud las características convencionales del semen y la incorporación de nuevos parámetros, sin descartar la participación del profesional

entrenado en esas determinaciones ya que es quien debe probar y evaluar la exactitud de los nuevos métodos.

## VI. LITERATURA CITADA

- [1] Barth, A.D. 1997. Evaluation of potencial breeding soundness of the bull. In "Current therapy in large animal. Theriogenology". Robert Youngquist ed., Chap. 28. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia, USA.
- [2] Bearden, H.J. y Fuquay, J. 1982. Reproducción Animal Aplicada. Editorial El manual moderno, Mexico, DF, Mexico.
- [3] Comhaire, F. and Vermeulen, L. 1995. Human semen analysis. Human Reproduction Update, Vol.1, N° 4, 343-362.
- [4] Davies, D., Hall, G., Hibbit, H. and Moore, H. 1975. The removal of the seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics. J. Reprod. fert. 43: 2, 305-312.
- [5] Evenson, D. and Thompson, L. 1991. Flow cytometric analysis of boar sperm chromatin structure as related to cryopreservation and fertility. Proceedings of the second International Conference on boar semen preservation, 165-183.
- [6] Madrid, N. 1998. Modificaciones en el sistema de evaluación reproductiva de los toros. Venezuela Bovina, Año 13 N° 39, 15-17.
- [7] Pérez y Pérez, F. 1985. Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Transplante de Embriones. Editorial Científico-Médica, Barcelona, España.
- [8] Rosenberger, G. 1981. Exploración clínica de los bovinos. 1ra. Edición. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, República Argentina
- [9] Salisbury, G., Vandemark, N. y Lodge, J. 1978. Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos. 2da Edic. Editorial Acribia, Zaragoza, España.