

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**PROCESAMIENTO DE SEMEN BOVINO  
PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

Por

Guillermo Viotti \*



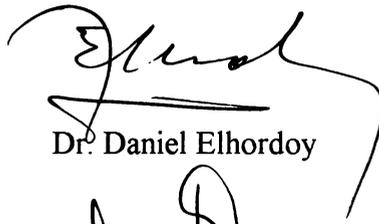
TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal  
Modalidad: Revisión Bibliográfica



FV-29377

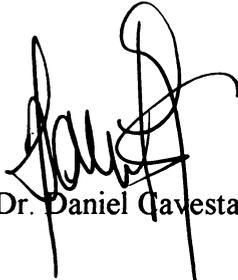
MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2011

TESIS DE GRADO aprobada por:



Presidente de Mesa:

Dr. Daniel Elhordoy



Segundo Miembro:  
(Orientador)

Dr. Daniel Cavestany



Tercer Miembro:

Dr. Jorge Gil

Fecha:

22/12/2011

Autor:

Guillermo Viotti

1  
29377

FACU  
Aprobado

TERMINARIA  
8 (ocho) 6/11

## **Agradecimientos**

A mis padres Daniel y Pilar, por velar siempre por nuestra educación y querer lo mejor para nosotros siempre. A mis hermanos, Fabiola, Rodrigo, Inés y Magui, por acompañarme siempre en este proceso, a Anita, Pepe y Fede.

A Mercedita Olazzarri por su amor y apoyo.

A la Tía Maite, la Tía Adriana y Abuela Carmen.

Al Dr. Daniel Cavestany por ser mi tutor y guiarme, al Dr. Daniel Elohrdoy y al Dr. Gil, por ayudarme a completar este ciclo y brindarme sus consejos.

A todos los amigos y amigas que siempre están ahí.

Al Dr. Rubens Carricaburu, Dr. Leonardo Gamarra y Dr. Juan Villamil, por motivarme en esta carrera desde muy temprana edad y colaborar conmigo en este proceso.

Al Ingeniero Agrónomo Roberto Sáez, por su gran contribución para conmigo.

A todos los docentes y funcionarios de facultad de veterinaria, que con su trabajo silencioso hacen que todo esto sea posible.

Al personal de establecimiento Dos Antonio y Santa Beatriz.

A los principales de Granja Roland, Familia Caorsi; al Dr. García Pintos y Dra. Florencia Sanguinetti. A Gensur, en especial a la Dra. Sabrina Luqueccini.

Tabla de Contenidos	Página
Agradecimientos	2
Resumen	5
Summary	6
1)- HISTORIA DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL	7
2)- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL	10
Ventajas de la inseminación artificial	10
Desventajas de la inseminación artificial	11
3)- RECOLECCION DE SEMEN BOVINO	12
- Método de la vagina artificial	13
- Método del masaje por vía rectal	15
- Método de electroeyaculación	17
- Métodos cruentos de recolección	17
- Recuperación desde la vagina de la hembra	18
- Preservativo o condón	18
4)- ESPERMATOZOIDE Y PLASMA SEMINAL	18
- Semen	18
- Morfología del espermatozoide	18
- Composición química de los espermatozoides	20
- Composición inorgánica de los espermatozoides	20
- Composición bioquímica de los espermatozoides	20
5)- PRUEBAS DE CALIDAD DEL SEMEN	21
-Controles macroscópicos	22
a- Volumen o cantidad de eyaculado	22
b- Aspecto general y movimiento de masa	23
c- Olor	23
d- Color	23
e- Acidez (pH)	23
-Controles microscópicos	24
a- Actividad cinética	24
b- Densidad	24
c- Motilidad individual	25
Métodos computarizados de estudio del movimiento	26
d- Determinación de células vivas y muertas	27
e- Determinación de anomalías espermáticas	28
f- Concentración espermática	30
g- Examen Viroológico y Bacteriológico del material seminal	31
6) MANEJO DEL SEMEN LUEGO DE SU OBTENCION	32
Principio de preservación del semen	33
a- Diluyentes	36
Funciones de un Diluyente	36
- Tipos de diluyentes	36

- Generalidades	36
- Componentes básicos de un diluyente	37
1 - Agua destilada	37
2- Sustancias buffer y no iónicas	37
3 - Materiales orgánico	39
4 - Agentes crioprotectores	40
5 -Azucares	42
6 -Aditivos	42
7 -Antibióticos	43
8 -Antioxidantes	44
9 -Minerales	45
Diluyentes comerciales a nivel mundial	45
Procesamiento	46
Tipo de Envases	46
Semen	46
Procesamiento en Pajuelas	47
(a) Cálculo de dilución	47
(b) Enfriado	49
(c) Glicerolización (adición de glicerol)	49
(d) Equilibración	50
(e) Envasado	51
(f) Congelación	52
(g) Descongelado	53
Semen sexado, técnica y consideraciones varias	54
III- Evaluación del semen post congelado	56
- Evaluación morfológica post descongelado	56
- Motilidad espermática	56
- Análisis de la viabilidad espermática	57
- Capacidad metabólica	58
- Integridad del acrosoma	58
- Integridad de la cromatina	58
- Análisis de la funcionalidad mitocondrial	59
- Test de termorresistencia	59
- Métodos funcionales de evaluación in Vitro	59
- Test swim-up	60
- Test de unión espermática o explantos del tracto genital femenino	60
- Evaluación de la estructura de la membrana plasmática (capacitación)	61
- Reacción acrosómica	61
- Test de unión del espermatozoide a la zona pelúcida	62
- Recuento de espermatozoides accesorios	62
- Penetración in Vitro	63
- Fecundación in Vitro (FIV)	63
7) BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	64

## **Resumen**

Se desarrolló el tema de procesamiento de semen en toro, desde los orígenes de la técnica y su evolución en el tiempo, las ventajas y las desventajas de la técnica; los diferentes métodos de colección, así como también las pruebas de calidad del semen tanto macroscópico y microscópico, y el procesamiento de las muestras luego de la evaluación para su posterior congelación. Los diluyentes, sus componentes y los diferentes tipos de envasados han sido incorporados a esta revisión. En particular, se ha tratado el tema que es relativamente nuevo de los antioxidantes, su aplicación en las muestras y su efecto benéfico en la fertilidad, así como también microelementos y minerales, que en su ausencia o menor proporción en las muestras implicarían cambios en los niveles de concepción y tasa de no retorno al celo de las hembras inseminadas con dichas muestras. También se considera el semen sexado, técnica relativamente nueva que ha tenido un gran impacto en la producción animal. No solo se describe las técnicas de procesamiento del semen hasta la congelación, sino que además la evaluación de las muestras seminales luego del descongelado para poder predecir lo más acertadamente posible el nivel de fertilidad de las mismas mediante la evaluación de la motilidad, la integridad y la estabilidad de membrana de los espermatozoides.

## **Summary**

This review covers the issue of artificial insemination, from the origins of the technique and its evolution over time, the advantages and disadvantages of different technical methods of collection, as well as tests of semen quality both with a macro and microscopic approach, and the processing of samples after freezing for later evaluation. Diluents, extenders components and different types of packaging have been incorporated into this review as well. In addition, the issue that has been addressed and is relatively new is antioxidants, their utilization in the samples and their beneficial effects on fertility, as well as the presence of trace elements and minerals that the absence or lower proportion in the samples would imply changes in conception levels and rate of no return to estrus of the females inseminated with these samples. This research not only describes the processing techniques to freeze semen but also the evaluation of semen samples after thawing to predict as accurately as possible their level of fertility by assessing sperm motility, integrity and membrane stability of spermatozoa. Sexed semen is considered as well. Finally, only bovine was considered as it is the specie which is globally more widespread and there are no limitations to its implementation, as opposed to the case for the equine species in our country and other countries where there exist some restrictions in certain breeds.

## **1) Historia de la Inseminación Artificial**

Desde el siglo XIV se hablaba de un jeque árabe que recogió semen mediante un trozo de algodón introducido en la vagina de una yegua antes de ser servida por un padrillo y luego de la monta lo insertó en la vagina de su propia yegua. Según cuenta escrituras, se logró que se produjera la concepción (Roberts, 1979). Sin embargo, dada la dificultad existente asociada con la inseminación artificial en equinos, y los bajos índices de preñez con esta técnica y en esta especie, se sostiene que esto es solo una fantasía, y que era la vía de legitimar pedigrís falsos (Salisbury, 1978).

En 1677 Anton Van Leeuwenhoek y su pupilo John Hann, descubrieron los espermatozoides con el uso de “lentes de aumento”. Según fue reportado por Dobell (1932), se refirieron a una innumerable cantidad de cuerpos minúsculos, los cuales llamaron “animáculos”, los cuales se movían con fuerza.

El primer trabajo sobre inseminación artificial en animales domésticos fue conducido por el italiano fisiólogo Lázaro Spalanzani en 1780. Él ya había tenido experiencia con anfibios en este tema cuando decidió experimentar con perros (Roberts, 1979). Estos fueron confinados en la casa de Spalanzani y luego de un lapso de 20 días, las perras demostraron indicios de celo (Perry, 1960). Luego, con el semen a temperatura corporal, fueron inseminadas artificialmente. El semen fue depositado en el útero con una jeringa y 62 días después de la inseminación, la perra tuvo tres perritos los cuales no solo eran similares a la madre sino que también al padre (Perry, 1960).

En 1782 el experimento de Spalanzani fue repetido por Rossi y evaluado por el profesor Branchi (Perry, 1960). Spalanzani descubrió a su vez que cuando el semen era filtrado, el líquido filtrado era infértil y el remanente que quedaba en el filtro era altamente fértil. Spalanzani, contribuyó al conocimiento sobre el efecto del enfriado sobre el semen, el cual prolongaba la vida de los espermias. Observó que el semen del padrillo enfriado en la nieve o en el clima frío no necesariamente mataba los “vermiculos espermáticos”, pero el movimiento disminuía hasta que los mismos fuesen expuestos al calor, luego del cual el movimiento continuaba por 7 horas y media (Roberts, 1979).

Su descubrimiento dio inicio a intensas investigaciones de las células sexuales y la fisiología de la fertilización, pero estos estudios no tuvieron el impacto tan fuerte del que se esperaba hasta largo tiempo después. En efecto, esto no fue hasta bastante entrado en el siglo XIX que fueron retomados en Europa y América (Roberts, 1979).

Heape escribió que el trabajo de inseminación es fácil de realizar, y una sola eyaculación sirve para inseminar varias perras. Afirmaba que este método puede ser utilizado para cruzar razas de perros, las cuales por servicio natural sería imposible por los diferentes tamaños. Heape también se refirió al estudio en yeguas cuyo objetivo fue fundamentalmente tratar el caso de la infertilidad (Perry, 1960).

Pearson, profesor de medicina veterinaria de la Universidad de Pensilvania, escribió a Heape ya que él y un grupo de veterinarios habían tenido éxito en la inseminación de yeguas en varias granjas (Perry, 1960).

En 1890 el veterinario francés Repiquet, afirmó que el uso de la inseminación podía ser utilizado con el fin de corregir la infertilidad. En diferentes stud de países europeos, la concepción por medio de la inseminación fue muy baja. Este punto fue el inicio de muchas investigaciones con el fin de mejorar la misma. El profesor Hoffman de Stuttgart, recomendó el uso de la monta natural del padrillo luego del servicio por inseminación. Escribió: “En cualquier conducta equina, el servicio por el padrillo es necesario lo más pronto posible para lograr introducir el esperma directamente en el útero de la yegua a través del orificio uterino” (Perry, 1960), y dio detalles sobre la técnica y el instrumental necesario.

Luego que el padrillo servía la yegua, el semen depositado en la vagina era colectado en la parte más baja de la misma con una especie de cucharón. El semen fue colectado en una jeringa especial, luego diluido en leche de vaca y posteriormente introducido en el útero de otras yeguas. Afirmó que la transferencia de semen de una yegua a otra no tenía problemas de importancia práctica (Perry, 1960). Al mismo tiempo en Dinamarca, Sand y Stubolt obtuvieron cuatro sucesos de preñez en un total de ocho yeguas inseminadas. Sand reportó en la Northern Livestock Conference en Copenhagen en 1902, que el beneficio más importante de esta técnica era el uso económico del semen de un padrillo de alto valor (Perry, 1960).

El investigador ruso y líder pionero en la inseminación artificial fue Ivanoff (1922). En 1899 fue requerido por el jefe del Royal Russian Stud para determinar las posibilidades del método para su uso en equinos. Bajo su dirección, la inseminación artificial fue practicada por numerosas granjas equinas, pero los resultados no fueron uniformemente buenos. El mismo intentó la técnica en pájaros (Perry, 1960). Ivanoff fue el primero de tomar la iniciativa de realizar la inseminación en el ganado vacuno y lanar. Un comité especial aprobó la iniciativa para investigar esta técnica en vacas, de las cuales 10 vacas fueron inseminadas e Ivanoff obtuvo éxito positivo en algunas de ellas. El mismo éxito tuvo en ovejas de la estación experimental de Askanya Nova.

Estos resultados despertaron mucho interés y la sección de fisiología fue establecida en el laboratorio veterinario del Ministerio de Agricultura, con el principal fin de estudiar la fisiología de la fertilización y entrenar veterinarios en la técnica de la inseminación artificial. Ivanoff estuvo a la cabeza de esta sección, y durante el año anterior a la primera guerra mundial entrenó entre 300 y 400 hombres, los cuales muchos fueron enviados al exterior para practicar la inseminación (Perry, 1960).

Entre 1913 y 1917 un total de 323 yeguas fueron inseminadas artificialmente en el Japón.

En 1914 Amantea, profesor de Fisiología de la Universidad de Roma, inició los experimentos con espermatozoides utilizando perros, gallos y palomas (Bonadonna, 1986). También fue Amantea quien consiguió desarrollar la primera vagina artificial para perros (Perry, 1960).

Un poco más tarde, Milovanov (1938) utilizó los reportes de Amantea en sus intentos de desarrollo de la vagina artificial para toro, padrillo y carnero. Uno de los primeros en Inglaterra fue Arthur Walton (1933), quien aportó mucha información acerca del manejo del semen, basándose en muchos experimentos. Walton junto con Prowochenski fueron los primeros en realizar experimentos a larga distancia donde, en 1936,

colectaron semen de un carnero Suffolk en Cambridge; luego de enfriado a 10 grados fue transferido a termos conteniendo hielo picado y enviado por vía aérea al Pulawy Zootechnical Institute en Polonia. Aquí, 5 ovejas fueron inseminadas con semen de este carnero 2 días y 3 horas luego de su colecta; 2 ovejas quedaron preñadas y una parió un cordero macho que tenía las características raciales del Suffolk.

En Uruguay la inseminación artificial se conoce desde 1933, con el nacimiento de un potrillo fruto de ésta técnica. En 1937 son exhibidos en la Exposición del Prado, borregos Lincoln producto de la inseminación artificial (CIAVT, 1987).

En granjas ovejeras, la inseminación artificial fue muy popular y en muchas majadas éste método era el único modo de servicio. En 1936, Jens Gylling-Holm, quien era el promotor de agricultura de Tranebyaerg, organizó la primera asociación cooperativa de servicios de inseminación artificial en Dinamarca. Esta cooperativa contaba con 220 miembros y el primer año fueron inseminadas 1.070 vacas (Perry, 1960).

Mientras, en Estados Unidos, fue la North Central School of Agriculture and Experimental Station en Grand Rapids, Minnesota quien realizó una gran cantidad de inseminaciones, y entre el año 1937 y 1938 logró la preñez de 98 vacas (Perry, 1960).

El número de vacas inseminadas según la “71 Organización de Criadores de Ganado de USA” en 1958 totalizó 6.645.568 en un total de 975.372 rodeos, aproximadamente el 30% del rodeo lechero de USA. Se informó que un solo toro sirvió a más de 140.000 vacas, y muchos otros entre 30.000 a 40.000 (Perry, 1960).

El hecho de mantener solo algunos toros en los centros de inseminación, del cual muchos afiliados pudieron hacer el uso de los mismos, trajo aparejado un gran ahorro para la Asociación de Criadores (Perry, 1960).

Un nuevo descubrimiento en el campo de la inseminación fue desarrollado en 1949, cuando Polge, Smith y Parker desarrollaron métodos prácticos para la preservación del semen durante un largo tiempo, por medio de la congelación con hielo seco a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Perry, 1960).

Polge y Rowson observaron que el glicerol protege el esperma frente a las bajas temperaturas y además probaron la capacidad fertilizante del semen de toro, el cual fue “buffereado” con yema de huevo, citrato de sodio, equilibrado con glicerol y diluido por algunas horas antes del congelado. Los resultados de los niveles de concepción fueron aceptables. Este descubrimiento permitió enviar semen de toro congelado en ampollas de vidrio de un país a otro, transformándose en una práctica común. El refrigerante fue por un lado el hielo seco, y por otro el nitrógeno líquido (Perry, 1960).

La Waterloo Cattle Breeding Association de Waterloo, Canadá, fue la primer organización en el mundo que utilizó 100% semen congelado en los inicios de 1954 (Perry, 1960). También en 1954, McEntee comunica que el agregado de antibiótico al semen congelado evita la infección con *Campylobacter fetus* a las hembras susceptibles (Perry, 1960). A su vez, en el año 1958 en Uruguay, se obtuvo el primer ternero nacido de fecundación artificial con semen congelado (CIAVT, 1987).

En 1964 Nagase y Niwa reportan en un congreso internacional el método de congelación en pellets; mientras Cassou en Francia introduce el método de envasado de las pajuelas y el uso de la pistola de inseminación artificial (CIAVT, 1987).

El Ontario Veterinary College de Guelph, Canadá, fue quien realizó a gran escala el procesado de semen congelado y el desarrollo de equipos para el almacenamiento y uso en el campo (Perry 1960).

En el año 1965, Duran del Campo congela pastillas de semen de toros de alta calidad genética de esa época, y 30 años después el semen es reevaluado in vitro e in vivo obteniendo buenos resultados en cuanto a calidad y porcentaje de preñez (Bonadonna, 1986).

Por otro lado, la inseminación fue utilizada para crear animales híbridos entre especies que no se aparean voluntariamente, por ejemplo el Zebroide, el cual es el producto del cruce entre el macho cebrá y la yegua. A su vez se tuvo descendencia entre la cruce del ganado doméstico, el Cebú y el bisón (Perry, 1960). También dicho procedimiento fue prueba contundente para probar la imposibilidad de cruzar ciertos animales, por ejemplo, la cruce entre la cabra y la oveja, el perro y el zorro, y entre el conejo europeo y la liebre (Perry, 1960).

El número de trabajadores en el campo de la inseminación artificial creció rápidamente. Fueron desarrolladas varias técnicas que mejoraron los métodos y las formas de colecta, así como el manejo del semen y de los animales de granja para la inseminación. Por medios de estos avances, muchos factores fueron desarrollados y tenidos en cuenta para la biología y la bioquímica del esperma, la secreción de las glándulas reproductivas del macho, de la ovulación y del celo en la hembra y su relación entre ambos (Perry, 1960).

## **2) Ventajas y Desventajas de la Inseminación Artificial**

### ***Ventajas:***

Las ventajas de la inseminación son bien conocidas y superan ampliamente las desventajas.

La principal ventaja de la inseminación artificial deriva de su aplicación en la mejora genética, aunque también tiene importancia en el control de las enfermedades de transmisión venérea. La mayor contribución, con todo, es la posibilidad de utilizar al máximo los mejores sementales. Se ha comprobado que un solo toro ha contribuido a engendrar entre 100.000 y 200.000 terneros en un mismo año (Maule, 1969).

La posibilidad de mantener almacenado casi indefinidamente, mediante congelación, material seminal por largo tiempo permite realizar pruebas de progenie aunque el toro haya muerto. Se pueden construir grandes bancos de almacenamiento de semen procedente de toros jóvenes. Con el uso de los mejores toros de forma masiva, por medio de la inseminación artificial, la producción media del ganado vacuno lechero aumentó un 30%, en comparación con las explotaciones en las que se seguía utilizando monta natural (Maule, 1969).

La posibilidad de invertir para construir centros de inseminación artificial permite una selección científica de los sementales en relación al comportamiento genético y la posibilidad de reconocer de manera precoz las posibles alteraciones genéticas de la progenie. Además de la cuidadosa selección en relación con la mejora genética, los toros utilizados en los centros están sujetos a rigurosos análisis para asegurar que estén libres de enfermedades reproductivas y otras enfermedades (ej., tuberculosis, brucelosis, tricomoniasis, vibriosis genital, IBR y leucosis bovina) (Arthur, 1991).

El manejo de los toros incluye alimentación, cuidados veterinarios y una utilización regular y controlada de su capacidad genética en los centros de inseminación artificial. Es de destacar que se evita el peligro de manejar toros problemáticos, ya que bien conocido es el carácter agresivo de algunos toros cuando son manejados en el rodeo.

Teniendo en cuenta los cuidados ofrecidos a los sementales, el manejo de primera clase y los chequeos rutinarios de la calidad del semen, el nivel de fertilidad ofrecida por la inseminación artificial es muy alto.

Otro efecto práctico de la inseminación es el incremento del ahorro, particularmente el de disminuir los costos de mantenimiento de los sementales (Maule, 1962). En los centros de inseminación cuesta U\$S 50.000 probar el valor genético de un toro joven. Puesto que solo 1 de cada 10 toros analizados se conserva en general como padre probado, cada uno de estos toros que llega como padre, representa una inversión de unos U\$S 500.000 (Chauvie E. ABS Uruguay, comunicación personal, 2010).

Se ha facilitado la importación de animales exóticos de razas Charolais, Limousin y Simmental a países de fuera de Europa por la aplicación de la inseminación. Por otro lado, se ha podido introducir nuevas líneas sanguíneas a partir de estos animales por la importación de semen de ellos. La inseminación permite apareamiento sin riesgo de lesiones entre vacas y toros de diferentes tamaños.

Se permite la recogida de semen de toros con incapacidad para la monta, mediante la extracción de semen por electroeyaculación. Durante un foco de aftosa, la seguridad del semen congelado recogido antes de que apareciera la enfermedad, permite mantener el servicio de inseminación en el área afectada (Arthur, 1991).

### ***Desventajas:***

Para el éxito de la inseminación artificial se necesita de una alta eficiencia técnica del centro encargado de la misma. Si ocurre alguna deficiencia en la etapa de procesamiento de semen, se puede causar una esterilidad temporal en las vacas en que se haya utilizado. Se requiere técnicos bien entrenados para supervisar la recolección, examen, dilución, congelamiento y envío. A menos que se realice un adecuado registro de cada vaca, y a menos que el ganadero esté acostumbrado a la detección de celos, la eficiencia del método puede resentirse gravemente. La inseminación de vacas que no estén en celo no solo puede causar esterilidad, sino que también metritis y aborto si la vaca está preñada (Arthur, 1991).

A veces la necesidad del ganadero de tener que comunicarse con el centro de inseminación cuando una vaca está en celo, y el hecho de que es necesario disponer de personal para identificar la vaca y ayudar al inseminador en el momento de su llegada,

radica en un trabajo adicional a la rutina del predio. La utilización de un número reducido de toros de forma extensiva y continuada puede dar la oportunidad de una amplia distribución de genes nocivos y su concentración en ciertas explotaciones, dando serios problemas de esterilidad. También pueden transmitirse enfermedades con la inseminación, especialmente aquellas cuyo agente etiológico no se destruye por los antibióticos, por ejemplo *Mycobacterium bovis*, el cual resiste también el congelado, pudiendo causar lesiones genitales en la hembra que se inseminó (Arthur, 1991). Técnicos o propietarios no controlados e inescrupulosos podrían sustituir esperma bueno por el de animales poco valiosos.

Otros motivos de fracaso de la inseminación serían:

- 1) **Falta de supervisión veterinaria:** para asegurar el empleo correcto de la técnica y subsanar vicios cometidos por los inseminadores, que llevan a las fallas en la concepción, es imprescindible la supervisión por un profesional veterinario, con el fin de corregir los errores y fallas que se cometan, así como el verificar la calidad de los productos que se emplean.
- 2) **Motivos debido al semen:** mala calidad (ej., baja vitalidad o fertilidad), por alteraciones sufridas durante su conservación, o por fallas en el diluyente el cual puede ser de mala calidad o estar alterado.
- 3) **Motivos debido al inseminador:** falta de higiene, de manos, material, termo, etc., fallas en el desarrollo de la técnica (motivación), errores en el descongelado, errores en la canulación, fallas en el tiempo de inseminación, falla en la detección de celos, ignorar signos de celos, fallas en la anotación, poco tiempo de observación.
- 4) **Motivos inherentes al animal:** las vacas de alta producción láctea, generalmente tardan más en presentar el primer celo postparto, y requieren más servicios para quedar preñadas. También pueden existir desequilibrios hormonales: vacas repetidoras, celos silentes, anestros, celos irregulares (largos o cortos), ninfomanía, etc. Frente a la ocurrencia de toros difusores de enfermedades, es el caso de 7H0543 Carlin-M Ivanhoe Bell BL (1979), donde por medio de estudios retrospectivos se determinó el origen y difusión a todo el mundo de dos enfermedades muy importantes: (a) Complejo de Malformación Vertebral (CMV) y, (b) la Leucosis Bovina Enzootica (BLAD) (Llambi y Arruga 2002).
- 5) **Motivos del establecimiento:** en períodos de déficit nutricionales se altera la presentación de celos. Con temperaturas ambientes muy altas disminuye la duración e intensidad de los celos, pudiendo llegar a producir anestros y fallas en la concepción. Presencia de enfermedades infecciosas: enfermedades venéreas, leptospirosis, brucelosis y tuberculosis. (CIAVT, 1987)

### 3) Recolección de Semen en Bovinos

En los bovinos los métodos más empleados para recoger semen son:

- a) método de la vagina artificial
- b) masaje por vía rectal de las vesículas seminales y de las ampollas deferentes

- c) electroeyaculación
- d) métodos cruentos
- e) recuperación de la vagina luego de la monta
- f) preservativo o condón

### **a) Método de la Vagina Artificial**

La primera vagina artificial para bovinos se construyó en Rusia y se adoptó en la práctica en 1932. Luego este instrumento se comenzó utilizar en todos los países, donde también cada experimentador y muchos técnicos introdujeron diversas modificaciones interesantes (Perry, 1960). Existen varios modelos de vagina artificial (ej., Danés, Americano, Italiano, entre otras), donde solo existen pequeñas diferencias una con otra.

Consta de un tubo cilíndrico externo de tela de goma rígida, de 60 cm de largo en el modelo grande, y 40 - 50 cm en el pequeño. El espesor del tubo es de 0.5 – 0.7 cm y el diámetro de 6 cm. Del lado interno del tubo rígido, en correspondencia con el extremo llamado peneano donde el toro introduce el pene, se fija un disco de espuma de goma de 1.5 cm de espesor y fijado solo en el medio, de modo que las partes se unan al desarmar el instrumento. En correspondencia con el extremo opuesto, se aplica un anillo de espuma de goma de 1.5 cm de espesor. El disco y el anillo cumplen una misma función: impedir que el agua del intersticio desborde los extremos del cilindro hueco y se acumule en uno de ellos o en ambos, lo que representa un serio inconveniente y, entre otras cosas, puede determinar la ruptura de la camisa interna.

La camisa entera de látex es blanda, muy elástica y muy extensible. Sin duda es preferible el tipo enterizo. El largo del entero, o camisa interna, en el modelo común es de 87 cm, o sea 27 cm más que el tubo rígido (Bonadonna, 1986).

En otros modelos, para la salida del aire comprimido los recolectores tienen un pequeño agujero en la pared, hacia lo alto, aunque a veces también permite que se deslice hacia fuera parte del semen (Bonadonna, 1986).

La presión y temperatura adecuada de la vagina artificial se obtiene llenando con agua de la mitad a dos terceras partes del espacio existente entre la camisa, según el tamaño del pene del toro. Durante la recolección, la temperatura interna de la vagina artificial debe estar entre 40 – 52 °C. Solo se debe aplicar una pequeña cantidad de lubricante, mediante una varilla de vidrio esterilizada, para impedir que un exceso de éste se mezcle con el semen. El lubricante puede ser vaselina blanca esterilizada o aceite mineral blanco puro. Si la temperatura de la vagina artificial es demasiada baja, el toro por lo general no efectúa la estocada ni eyacula; si es demasiada elevada pueden morir algunos espermatozoides, o provocar dolor al toro, que luego sentirá temporariamente miedo por este método de colección (Roberts, 1979).

Por otro lado se encuentra el *maniquí de extracción*. El color de la cobertura del maniquí tiene importancia secundaria. En general, los colores oscuros son preferibles. Aun cuando se trate de toros de rebaño y en servicio, el porcentaje de los que aceptan el maniquí la primera vez es aproximadamente el mismo, como también el de los toros que eyaculan regularmente en la vagina artificial. Cuando el operador no es lo suficiente precavido y hábil, las cosas pueden modificarse con el tiempo, por lo cual a veces

después de pocos días el toro rechaza el maniquí o no eyacula en la vagina artificial (Bonadonna, 1986).

Cuando se practica la recolección, el operario se debe colocar a la derecha del maniquí o del animal vivo empleado como súcubo, empuñando en mano derecha la vagina artificial, con la mano derecha un poco más debajo de la mitad, y con el recolector dirigido hacia arriba. Con la mano izquierda a su debido tiempo – o sea cuando el toro está realizando el salto y la erección es completa – la base del prepucio, evitando tocar el glande y la mucosa del pene (Bonadonna, 1986).

La recolección con la vagina artificial sostenida a mano no exige ningún esfuerzo especial por parte del operador quien, una vez penetrado el pene, se limitara a dejar el prepucio y a seguir, con el instrumento, el enérgico movimiento hacia delante y arriba que el toro cumple a su vez, con el impulso violento hacia arriba y delante de la pelvis. Es conveniente antes de la colección que el toro se excite viendo a otros toros montar, o realizando falsas montas, así de una vez que se vaya a realizar la colecta se obtiene mayor cantidad y calidad de semen colectado (Bonadonna, 1986). Para contribuir a reducir la carga de gérmenes en el semen, y por razones higiénicas generales, en la mayoría de los centros se recomienda que el operador use guantes de goma que cambiara todas las veces (Salisbury, 1978).

El sitio donde se va a realizar la colección debe ser seco, libre de polvo, suciedad y barro. El lavado de la cavidad prepucial con suero fisiológico caliente antes del servicio tiene valor dudoso en lo que respecta a reducir las bacterias presentes en el semen (Bonadonna, 1986).

Cuando se cumple el salto eyaculatorio se debe extraer la vagina artificial y colocarla en posición vertical con el recolector hacia abajo; luego el operador debe alejarse del toro para evitar que algún brusco movimiento pueda volcar el semen recogido o romper el recolector. Cuando en lugar del maniquí se utiliza, como sucede normalmente, un animal vivo, se debe cuidar (en especial si es vaca) que esté sana y es preferible un animal tranquilo, mantenido exclusivamente para este fin. La cola debe estar fija, unida a los genitales externos.

De todos modos, ya sea que emplee el maniquí o el animal vivo, es conveniente tomar estas precauciones:

- a) Cuando no se logra introducir en seguida el pene en la vagina artificial, es preferible hacer bajar el toro y volver a efectuar el salto, sin insistir nunca en mantener el instrumento sobre el pene.
- b) Si el impulso eyaculatorio no es inmediato es inútil insistir; es mejor hacerlo bajar, intentar que se mueva un poco y después volver a llevarlo para que repita el salto (a veces es mejor llevarlo corriendo), naturalmente no sin controlar primero si la vagina artificial está montada en la forma debida y si la temperatura del agua es la correcta y no *demasiado fría* (cuando el toro deja el pene en la vagina y no eyacula), o *demasiado caliente* (cuando retira el pene en seguida, y la mucosa aparece más bien enrojecida). Se puede en cierta forma impulsar al toro a saltar casi invitándolo, si se lo obliga a apoyar el hocico sobre el dorso del maniquí o del animal vivo.

- c) Cuando no hubo erección y el pene no salió de la bolsa prepucial, conviene repetir el salto porque, mientras en algunos sujetos el acercamiento al orificio de entrada de la vagina al orificio prepucial basta estimular la rápida erección del pene y sin duda el impulso eyaculatorio, en otros eyaculan casi sin erección.
- d) El operador debe vigilar atentamente los movimientos del toro y el suyo propio.

Después de cada colección debe lavarse inmediatamente con agua caliente el cono y la camisa de goma. Todo equipo de vidrio, metal y goma debe lavarse y cepillarse con solución tibia de 0.2 - 0.3% de hexametáfosfato de sodio o 0.3- 0.5% de pirofosfato de tetrasodio y enjuagarse prolijamente con agua caliente. Perry afirma que no debe usarse detergente orgánico sintético para lavar y esterilizar el equipo de inseminación artificial. Si se los utiliza el enjuague debe ser muy cuidadoso. Luego secar todas las partes del equipo, se las enjuaga en alcohol etílico al 70%, y se las deja secar en un depósito libre de polvo y bien ventilado. No deben utilizarse otros alcoholes, como el metilico o el desnaturalizado (Bonadonna, 1986; Salisbury, 1978).

La vagina artificial puede también esterilizarse por ebullición, o colocándola en un autoclave, aunque esto deteriora más rápido las gomas.

Con el método de la vagina artificial se obtiene una muestra de semen limpio y concentrado con un equipo simple y barato, y proporciona información sobre el impulso sexual del animal (Bonadonna, 1986; Salisbury, 1978). Tiene la desventaja que se requiere un toro relativamente entrenado y dócil, y un súcubo adecuado. El peligro de lesión de la persona que actúa es mayor que otros métodos de colección (Bonadonna, 1986).

## **b) Método del Masaje por vía Rectal**

En 1934, Miller y Evans en América del Norte, estudiaron el llamado método del masaje. Desde 1925, Casa había aludido a la posibilidad de obtener el semen masajando las ampollas seminales por vía rectal (Salisbury, 1978).

El principio teórico en el cual se basa el método es el de obtener, mediante la compresión manual, la emisión por el conducto deferente y la uretra del contenido, sobre todo de las ampollas seminales. Como de hecho se conoce la influencia poco favorable que ejercen sobre los espermatozoides las secreciones de las glándulas anexas cuando son excesivas, precisamente por la secreción de la vesícula seminal, el operador debe tener cuidado que salga el contenido de la ampolla lo más separada posible del de la vesícula, dada la relativa independencia de los dos órganos, y la no correspondencia absoluta en la estimulación de los respectivos órganos (Bonadonna, 1986). Las deducciones esenciales se pueden sintetizar de la siguiente manera:

- 1) el método del masaje de las vesículas y ampollas seminales ofrece, en comparación con la vagina artificial, las siguientes ventajas:
  - (a) no demanda instrumental complejo y costoso alguno, ni pre-organización especial en el lugar donde se mantiene el toro.

- (b) casi todos los toros se adaptan al método, que además puede utilizarse sobre todo cuando se trata de animales con dificultad o imposibilidad de efectuar la monta y por lo tanto el servicio normal (ej., por edad, lesiones etc.), o que se niegan a eyacular en la vagina artificial, etc.
- 2) por otra parte, el método presenta las siguientes desventajas, siempre en comparación con la vagina artificial:
- (a) en general el semen está mezclado con las secreciones de las glándulas sexuales anexas, que lo diluyen más y dificultan su conservación in vitro;
  - (b) el vasto contacto del semen así obtenido con el aire, dado que la emisión es casi siempre por goteo, tiene como consecuencia un mayor daño de los espermatozoides;
  - (c) el contacto con el aire y la imposibilidad de esterilizar el orificio prepucial, debiendo limitarse solo a la limpieza, consigue únicamente una mayor carga de gérmenes en el semen recogido con el masaje, que en el obtenido con la vagina artificial.
  - (d) con frecuencia el semen recogido está mezclado también con orina, cuya acción antiespermática inicial no es notable, por lo que vacas inseminadas artificialmente con semen fresco recogido mediante masaje, y con un intenso olor urinoso, quedaron preñadas y parieron regularmente; por el contrario, la conservación in vitro se hace imposible por cuanto la fermentación de la orina produce sustancias antiespermáticas.
  - (e) el método del masaje requiere cierta habilidad del operador y diligencia en la eyaculación (Bonadonna, 1986).

El material seminal es fácil de reconocer por sus características peculiares: gotas más pesadas, de mayor densidad, y casi de un color blanco lechoso; en cambio, el líquido seminal es más acuoso y claro, y muchas veces sale en chorros abundantes. El masaje puede hacerse en forma alternada con la mano izquierda y con la derecha y el operador debería tener las siguientes precauciones:

- a) entrar en la ampolla rectal con suavidad y no brutalmente,
- b) evitar dirigirse demasiado hacia craneal (25-30 cm),
- c) no comprimir exageradamente los órganos, no pellizcar la mucosa rectal, ni desplazar los órganos para masajear, etc.
- d) El masaje de las ampollas debe hacerse siempre de adelante hacia atrás y el de las glándulas vesiculares también desde adentro hacia fuera (Bonadonna, 1986).

Según investigaciones de Zamboni, el semen recogido por masaje presentó las siguientes características: **volumen:** 7-10 mL; **densidad:** sin particularidades; **intensidad de movimiento:** 5/5- 4/5, **color:** blancuzco salvo algunos casos de color amarillo; **olor:** peculiar muy intenso y a veces urinoso; **capacidad de conservación:** fuera del organismo es limitada.

### **c) Método de Electroeyaculación**

(FA)

Aparentemente, las primeras técnicas de electroeyaculación fueron realizadas por Battelli in 1922 quien introdujo electrodos en la base del cerebro en un cerdo de Guinea, macho (Salisbury, 1978). Por su parte, en ovinos éstas fueron efectuadas por Gunn en Australia (1935), y Olbrycht en Polonia (1937) (Bonadonna, 1986).

Las innovaciones redujeron notablemente el tiempo de recolección, así como los voltajes necesarios para lograr el mismo.

Por otro lado Hill (1956), entre otros, afirman que en el 90% - 95% de los casos de electroeyaculación hubo erección y protrusión del pene y los animales se mantuvieron tranquilos, con estrés físico escaso o negativo. Según Bonadonna, el método de la electroeyaculación se considera conveniente cuando no es posible usar la vagina artificial, sobre todo cuando el toro no pueda efectuar la monta, cualquier sea la razón. A su vez, el peligro de contaminación del material seminal en el toro es mayor con la electro-eyaculación que con la vagina artificial.

Marton practicó inseminación artificial con semen de toro obtenido mediante electroeyaculación o con vagina artificial. El autor considera que la diferencia de 4% observada a favor del material obtenido por electroeyaculación no es significativa pero interesante, ya que demuestra que ese material seminal no tiene efecto deletéreo en la fertilidad. Dicho trabajo fue confirmado por Singleton en 1970 (Bonadonna, 1986).

Asimismo Clarke y col. (1973), en Australia, compararon las características del semen obtenido con vagina artificial con respecto a electroeyaculación en toros con escasa libido. No se observó diferencia alguna, salvo un mayor volumen del eyaculado con electroeyaculación. Hay que tener cuidado de no aplicar la corriente hasta que los electrodos pasen el ano y estén en el recto, pues esto es doloroso para el animal. A veces un alambre roto o pelado en la base del vástago provoca reacciones anormales, especialmente observables al insertar el vástago y aplicar la corriente. Estímulos excesivos con los voltajes superiores pueden causar ataxia o, incluso, el toro puede caerse (Roberts, 1979).

La anestesia general o los tranquilizantes impidieron la electroeyaculación normal.

Algunos toros pueden segregar excesivo líquido seminal durante la electroeyaculación, lo que da por resultado semen con una baja concentración de espermatozoides (Bonadonna, 1986).

### **d) Métodos Cruentos de Recolección**

El método no tiene importancia práctica y puede servir a veces para investigación científicas. También en casos excepcionales, como el de animales salvajes, o para aprovechar hasta lo último a grandes reproductores muertos, etc. Los espermatozoides deben extraerse del extremo caudal del conducto deferente o de la ampolla seminal. Lo más simple, en el caso que el animal esté muerto, es la ablación del epidídimo con tijeras e inmersión del órgano en una pequeña cantidad de líquido diluyente para liberar a los espermatozoides, y filtrar todo con gasa esterilizada. Otro sistema es el de introducir una pipeta de vidrio en el conducto deferente y después aspirar el contenido

con una bomba conectada al extremo opuesto del mismo tubo de vidrio. Por último, los espermatozoides pueden obtenerse directamente del animal vivo por biopsia, o mediante absorción con una aguja de metal o, mejor, de vidrio. El método parece haberse usado con éxito especialmente en jardines zoológicos. El inconveniente es que a menudo el semen obtenido está mezclado con sangre. Es necesario disponer de un equipo de laboratorio no siempre fácil de obtener y hay peligro de que los espermatozoides resulten alterados por la acción tóxica del metal con el cual están hechas las agujas (Bonadonna, 1986).

Duran del Campo (1969) describió la utilización en la inseminación artificial de material seminal de toros Hereford extraído de la cola del epidídimo dentro de los 15 minutos de la muerte del animal. El contenido de la cola del epidídimo se mezclaba con 4-5 ml de diluyente glicerinado. El número de espermatozoides inmóviles resultaba elevado. Congelado y confeccionado el pellet, después del descongelamiento todavía presentaba una movilidad más bien reducida. Se inseminaron artificialmente 15 hembras bovinas de las cuales solo dos quedaron preñadas.

Rowson (1946) describió un método para recoger material seminal del toro, mediante una fistula uretral, que merece recordarse pues puede servir en ciertas investigaciones.

En conclusión, la recuperación de semen de los epidídimos del toro después de su muerte representa una posibilidad técnicamente posible, siempre que se proceda con pericia y precisión (Bonadonna, 1986).

#### **e) Recuperación Desde la Vagina de la Hembra**

Este método es el más antiguo y sencillo. Consiste en recolectar el material seminal luego de la monta por el macho. Esto se hace por medio de cucharones y/o jeringa desde el fondo de la vagina. Esta técnica es insatisfactoria debido a que solo se capta un volumen pequeño de semen y el mismo está mezclado con una gran cantidad de mucus vaginal, de modo que este método no resultaba adecuado para evaluar la calidad del semen. El material se encuentra altamente contaminado, por lo que es utilizado principalmente para verificar que la eyacuación realmente se produjo, pudiendo por otro lado evaluar limitadamente la calidad del mismo (Bonadonna, 1986).

#### **f) Preservativo o Condón**

Este método es utilizado principalmente en equinos, donde el dispositivo es colocado en el pene del animal. Se ha intentado introducir el dispositivo en la vagina de la hembra, pero el mismo resulta engorroso y complicado, utilizándose solo a nivel experimental únicamente (Roberts, 1979).

### **4) Espermatozoides y Plasma Seminal**

**Semen:** El semen es la suspensión líquida celular que contiene los gametos masculinos y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida de dicha suspensión se conoce como plasma seminal (Hafez, 2000).

#### Morfología del espermatozoide

## **Cabeza**

La característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta.

La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (ADN) y una clase especial de proteínas básicas llamadas portaminas espermáticas. Su número cromosómico y, por tanto, el contenido de ADN nuclear es haploide, o sea posee la mitad de los cromosomas de la especie en cuestión. La naturaleza espermática se debe a las divisiones celulares meióticas que ocurren durante su formación.

## **Acrosoma**

El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo y que se establece durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide.

Esta estructura en forma de casquete, que contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas, participa del proceso de la fecundación.

El segmento ecuatorial del acrosoma es importante debido a que es esta parte del espermatozoide, junto con el segmento anterior de la región post acrosómica, la que se fusiona inicialmente con la membrana del oocito durante la fecundación

## **Cola**

La cola está formada por el cuello y el segmento medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo. La placa basal del cuello es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola.

La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de ese segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, comprende el axonema. El axonema, como tal, se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. En el segmento medio, esta disposición de  $9 + 2$  de los microtúbulos está rodeada por nueve fibras gruesas o densas que al parecer está relacionada con las nueve dobletes del axonema. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática.

El segmento principal, que continua en sentido posterior desde el anillo citoplasmático y se extiende casi hasta la punta de la cola, está formada por el axonema en el centro y sus fibras gruesas asociadas. La vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola.

El segmento caudal o terminal, posterior a la terminación de la vaina fibrosa, contiene solo el axonema central cubierto por la membrana plasmática. El axonema es el que da la motilidad al espermatozoide. Los pares externos de microtúbulos del patrón 9 + 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes.

La gota protoplasmática o citoplasmática, que suele desprenderse de los espermatozoides tras el eyaculado, está compuesta de citoplasma residual. Aunque se le considera anormal en los espermatozoides eyaculados de la mayor parte de las especies, puede retenerse en la región del cuello, donde se conoce como gota proximal, o cerca del anillo citoplasmático, donde se le denomina gota distal (Hafez, 2000).

### Composición Química de los Espermatozoides

Los principales componentes químicos de los espermatozoides son ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Cerca de un tercio del peso seco de una célula espermática corresponde al núcleo. La cromatina nuclear está constituida por proporciones aproximadamente iguales de ADN y proteína. El casquete acrosómico contiene una variedad de enzimas. En la cola hay muchas proteínas estructurales, enzimas, así como lípidos (Hafez, 2000).

### Componentes Inorgánicos del Espermatozoide

Los espermatozoides son ricos en fósforo, nitrógeno y azufre. La mayor parte del fósforo está asociada al ADN, mientras que el azufre se deriva de proteínas nucleares básicas, y de los componentes de la cola.

### Componentes Bioquímicos del Espermatozoide

El núcleo de los espermatozoides está compuesto por cromatina condensada en la que el ADN es estabilizado por protaminas. Los núcleos de los espermatozoides de la mayor parte de las especies contienen solo protaminas, mientras que en otras especies contiene cantidades variables de histona más grandes, ricas en arginina. Estas proteínas nucleares básicas, importantes para la condensación y estabilización del ADN, son mantenidas juntas por enlaces sulfhidrilo. Dicha variante de enlace aumenta cuando los espermatozoides pasan al epidídimo.

Durante la fecundación los espermatozoides experimentan una reacción acrosomal en la cual la mayor parte del contenido acrosómico se libera o expone a través de aberturas creadas por fusión del plasma y membrana acrosómica externa.

La hialuronidasa liberada dispersa las células monticulares que rodean al ovocito recién ovulado. La proacrosina es el precursor de una enzima proteolítica, la acrosina que se piensa que ayuda a los espermatozoides que están penetrando, a digerir un camino a través de la zona pelúcida. El segmento ecuatorial difiere del casquete acrosómico en que su contenido no se libera durante la reacción acrosómica inicial, sino que es expuesta cuando el espermatozoide penetra en la zona pelúcida.

Sin embargo, los espermatozoides, pueden ser capaces de penetrar mecánicamente en la zona pelúcida por medio de su propia motilidad.

La vaina mitocondrial de los gametos masculinos, rica en fosfolípidos, varía mucho entre especies respecto al número de mitocondrias y composición bioquímica. Dichos gametos contiene enzimas del sistema respiratorio citocromooxidasa de citocromo y la vía glucolítica. Están presentes asimismo otras enzimas metabólicas, incluyendo la deshidrogenasa de lactato específica de los espermatozoides, conocida como LDH-X.

Los nucleótidos adenina y guanina, ricos en energía son componentes importantes de la energética espermática, como lo son también las proteínas del axonema, tubulina y dineina. Se ha demostrado que la dineina espermática, que es la principal proteína en los brazos de los microtúbulos axonémicos, es una ATPasa activada por cationes divalentes (Hafez, 2000).

## **5) Pruebas de Calidad del Semen**

Los exámenes de calidad del semen solo pueden ser realizados satisfactoriamente sobre eyaculados aproximadamente normales, dentro de un breve período posterior a la recolección (Roberts, 1979).

Los eyaculados deben ser adecuadamente protegidos y manejados hasta examinarlos. La evaluación del semen en el laboratorio no es una prueba de fertilidad. Algunos factores a tener en cuenta para el adecuado manejo del semen son:

- 1) la vagina artificial, o el recipiente empleado para recoger el semen en la electroeyaculación, debe estar limpio y libre de contaminantes que pueden dañar a los espermatozoides, como el alcohol, excesiva vaselina, polvo presente en las camisas nuevas de goma, y antisépticos o sustancias químicas de cualquier clase.
- 2) En el momento de la recolección, hay que evitar que la vagina se contamine con excesiva suciedad o desechos, incluido esmegma prepucial y secreciones; el agua y la orina dañan a los espermatozoides creando una presión osmótica diferente.
- 3) Las cantidades excesivas de sangre y suero pueden perjudicar a los espermatozoides.
- 4) El sobrecalentamiento y el enfriamiento demasiado rápido dañan a los espermatozoides.
- 5) La excesiva agitación y sacudimiento del semen afecta a los espermatozoides.
- 6) Debe evitarse la exposición excesiva al sol.

Es importante que la muestra de semen se examine lo más rápido posible después de obtenida. Existen en la actualidad incubadoras eléctricas portátiles que pueden conectarse con un circuito de 110 voltios para el calentamiento del equipo.

Mediante el uso de un microscopio la mayoría de los veterinarios expertos pueden realizar, mediante unos pocos procedimientos simples de laboratorio en el mismo

establecimiento rural, tres o cuatro pruebas de semen de un macho y determinar así su fertilidad probable con mayor precisión que en un laboratorio que recibe un solo eyaculado. El veterinario puede tener información adicional, por ejemplo sobre el deseo sexual, frecuencia del servicio, comportamiento durante el acoplamiento a raíz del cuidadoso examen físico que puede realizar y que en el laboratorio no conoce (Roberts, 1979). En este análisis, como en el caso de otras técnicas de laboratorio, hay que evaluar cuidadosamente los resultados sobre la base de la observación obtenida y de lo que se sabe respecto del caso; no se debe otorgar mucho crédito a los resultados del análisis efectuado sobre un solo eyaculado.

La mejor prueba de evaluación de fertilidad es la tasa de concepción de las hembras apareadas con el macho. Los exámenes de semen, si son cuidadosos, pueden proporcionar una medición rápida y razonablemente precisa de la fertilidad del macho y ser de valor para determinar la gravedad y la posible causa de la infertilidad que afecta a un macho. (Roberts, 1979).

Según Rajamannan y col. (1968) la calidad seminal del primer eyaculado, después de un largo periodo de reposo sexual, puede tener una motilidad disminuida y un aumento del número de espermatozoides muertos. La calidad del semen en muchos carneros y toros puede decrecer durante los meses cálidos de verano.

### *Controles Macroscópicos*

“La evaluación del semen es indicio de fertilidad, pero no prueba de ella” (Roberts, 1979).

#### A) Volumen o Cantidad de Eyaculado

El cálculo del volumen y de la concentración de espermatozoides del eyaculado debe hacerse de forma precisa, ya que de estos dos parámetros va a depender el número de dosis seminal que pueden elaborarse a partir de un eyaculado. El volumen debe calcularse mediante pesadas y transformación posterior de este valor mediante el factor de densidad correspondiente (Howard y Pace, 1998).

La comprobación del volumen directamente en un tubo graduado suele inducir errores, bien por la presencia de burbujas de aire, o por la inexactitud de la propia escala del tubo. El volumen se expresa en mL.

La cantidad de semen varía entre los individuos, pero a veces también varía en el mismo individuo, por el conjunto de factores que pueden actuar sobre la sexualidad masculina: especie, raza, edad, estación del año, alimentación, etc.

El régimen sexual tiene una importancia concreta, donde la notable hiperexcitación durante la época de servicios a veces hace aumentar el volumen del eyaculado por la abundancia de la secreción glandular secundaria. En ese caso, el semen asume casi siempre un carácter típicamente filamentoso. También el estímulo precoital prolongado favorece de la misma manera el aumento volumétrico del eyaculado (Roberts, 1979). La alimentación solo con forraje seco puede reducir la masa eyaculada que, en cambio, generalmente aumenta con el alimento verde.

Roux relaciona la cantidad de semen eyaculado con el peso vivo y suministra los siguientes datos: por 100 Kg. de peso vivo; toro 0.6 ml (Bonadonna, 1989).

#### B) Aspecto General y Movimiento de Masa

En general, el material rico en espermatozoides móviles tiene un aspecto relativamente homogéneo. En cambio, si los espermatozoides son poco móviles el aspecto se vuelve más granuloso. El llamado movimiento de masa es un dato empírico de juicio que se refiere a la motilidad de la masa como resultado del movimiento conjunto de los espermatozoides. Es particularmente evidente en el semen rico en elementos celulares vivos y activos, y se lo puede evaluar poniéndolo a contraluz. Sin embargo, la aparente escasez de actividad masiva no es un elemento suficiente para juzgar que determinado semen es menos bueno que otros (Bonadonna, 1989).

#### C) Olor

El olor natural es bastante característico de cada especie animal y en general no es muy intenso. El semen puede tomar un olor urinoso si se mezcla con orina, y un olor más o menos intensamente alterado, de putrefacción, cuando se mezcla con productos purulentos y trozos necróticos. Toma el mismo olor cuando el orificio prepucial está lesionado y supura, por grietas descuidadas, y por escasa limpieza (Bonadonna, 1989).

#### D) Color

En general el semen es de color blanco cremoso, que más o menos tiende al tono marfil, en relación con la cantidad de espermatozoides contenidos. Puede ser blanco grisáceo y al mismo tiempo normal. Se vuelve de color amarillo, también intenso, cuando se mezcla con la orina. En los bovinos, según Corneo (1940), es relativamente fácil la producción fisiológica de semen intensamente coloreado de amarillo (en el 10% de los casos), con alguna probable relación con la estación y el régimen alimentario.

Aun conservando inalteradas sus propiedades cualitativas y fecundantes, Corneo pudo demostrar que el color amarillo se origina por la acentuada producción de un lipocromo especial en la ampolla del conducto deferente. Según Kaemmerer y Kramowitz (1955), el tono amarillo del semen de toro y de macho cabrío se debe a la riboflavina contenida en las secreciones de las glándulas vesiculares, cuya presencia varía con la raza, alimentación y con el individuo. A veces el semen es de color verdoso, lo cual indica la existencia de procesos necrotizantes, de carácter purulento, causados por algún órgano del aparato genital masculino. El semen puede estar coloreado de rojo vivo por la presencia de sangre cuando hay heridas recientes en el prepucio, el glande o la uretra, a menudo producidas durante la recolección artificial (Bonadonna, 1989).

#### E) Acidez (pH)

La acidez del semen, o disminución del valor de hidrogeniones del medio, puede determinarse con más exactitud con los peachimetros comunes, y de manera más simple y con fines prácticos, con los métodos colorimétricos, empleando los papeles reactivos, de los cuales son preferibles los más sensibles. La mayoría de las muestras seminales están cerca de la neutralidad con una pequeña tendencia al ácido, variando entre un pH

de 6.5 a 6.9, pudiendo estar en un rango que va desde menos de 6 hasta un máximo de 8, o levemente por encima de este valor.

El semen de buena calidad es usualmente más ácido (pH menor) que las muestras de semen con baja concentración de semen. Normalmente el semen de calidad pobre contiene proporcionalmente más contenido de fluido proveniente desde las zonas bulbo uretral y las glándulas accesorias. (Salisbury, 1978).

Por otro lado, el semen colectado por medio de la vagina artificial usualmente tiene menor pH que el semen que es colectado por medio del masaje rectal. En este último método, el pH ronda en un rango de 7.5 a 8. Eyaculaciones sucesivas tienden a aumentar el pH, y el semen que no contiene espermatozoide, provenientes de toros que tienen inflamación de los epidídimos, o el semen obtenido por medio de la vasectomía, tienden a tener niveles de pH mayores (Salisbury, 1978).

El azul de bromotimol (también conocido como ftaleína sulfona bromotimol, azul de bromotimol y BTB) es una sustancia química indicador de la debilidad de los ácidos y bases. Utilizado en tales casos para evaluar el pH de las muestras seminales, el azul de bromotimol cambia a amarillo en el caso de la presencia de ácido y cambia al azul oscuro en caso de un medio alcalino. Esta sustancia es un método simple y rápido para saber las condiciones de pH de las muestras (Wikipedia, 2010).

### *Controles Microscópicos*

#### **A) Actividad cinética**

Swanson y Hermann informaron que una buena motilidad inicial por sí sola no es un indicio preciso de fertilidad del toro. Dichos autores citaron ejemplos de semen bovino infértil con excelente motilidad inicial de los espermatozoides, que la perdían rápidamente cuando se almacenaba, o espermatozoides muy móvil que eran infértiles (Roberts, 1979). A su vez la motilidad de los espermatozoides bovinos con hipoplasia testicular es mucho más pobre que en los casos de degeneración testicular. Blom y Bentinck-Smith informaron que gotas de vaselina en el semen reducía la motilidad de los espermatozoides. Hay que tener cuidado, al lubricar una vagina artificial, de no aplicar un exceso de lubricantes que pueda licuarse y pasar al tubo o frasco en que se recoge el semen. (Salisbury, 1978).

Método: colocar una gota de semen en un portaobjeto limpio, seco y entibiado a 38 °C y observar en el microscopio con objetivo panorámico.

Evaluación:   +++ motilidad de masa buena,  
                  ++ motilidad de masa regular,  
                  + motilidad de masa mala,  
                  0 motilidad de masa nula.

#### **B) Densidad**

Método: colocar una gota de semen en un portaobjeto limpio, seco y entibiado a 37 °C y observar en el borde de la gota la densidad del material con 450 aumentos.

Escala de valores:

<b>Símbolo</b>	<b>Denominación</b>	<b>Características</b>
DD	Densísimo	más de 1.500.000 espermatozoides/ mm <sup>3</sup>
D	Denso	800.000 a 1.500.000 espermatozoides/ mm <sup>3</sup>
SD	Semidenso	500.000 a 800.000 espermatozoides/ mm <sup>3</sup>
R	Ralo	200.000 a 500.000 espermatozoides/ mm <sup>3</sup>
OS	Oligoespermia	menos de 200.000 espermatozoides/ mm <sup>3</sup>
A	Azoospermia	ausencia de espermatozoides.

Interpretación de la observación:

D: se observan los espermatozoides superpuestos.

D: el campo óptico está lleno de espermatozoides y entre ellos no existen espacios.

SD: en el campo visual existen espacios intermedios entre los espermatozoides, del tamaño de una cabeza.

R: se observan espacios libres amplios.

OS: espermatozoides separados por grandes espacios.

A: no se observan espermatozoides.

### **C) Motilidad individual**

No todos los autores consideran de fundamental importancia práctica a la determinación del tipo y grado de movimiento de los espermatozoides. En rigor, el estado dinámico de por sí no basta para asegurar que también se haya conservado el poder fecundante, aunque un estado citodinámico irreversible siempre es expresión de muerte. Solo la verificación de una cinética alterada, con numerosos elementos inmóviles o escasamente móviles, expresa un reducido o nulo poder fecundante, especialmente cuando se trata de evaluar material seminal congelado, en el cual la relación proporcional entre espermatozoides móviles que recuperan el movimiento (revitalización) y los que permanecen inmóviles, asume un significado determinante.

Howe (1973) hizo notar que no se debe considerar a la motilidad de las células seminales como expresión de la capacidad fecundante, ya que son muy diferentes los prerrequisitos fisiológicos de los dos hechos.

Método: colocar una gota de semen sobre un portaobjeto limpio, seco y entibiado a 37 °C y colocar un cubreobjeto sobre ella. Observar con un aumento de 100X y 450X. Establecer el grado de intensidad y el tipo de movimiento.

Interpretación:

Tipos de movimientos:

a) Normal: movimientos progresivos rectilíneo uniforme caudocefálico, prácticamente en línea recta.

b) Anormal:

### 1) Movimiento rotatorio o circular

El espermatozoide describe círculos concéntricos con diámetro aproximado a su propia longitud. Por lo general este tipo de movimiento se ve cuando el ambiente biofísico y bioquímico está alterado, por lo cual su aparición demuestra una condición vital desfavorable, normalmente irreversible (Bonadonna, 1989).

### 2) Movimiento oscilatorio

El espermatozoide se mueve en sentido latero-lateral, sin avanzar. Este movimiento es frecuente en dos casos: en la fase de revitalización inicial del estado dinámico que estaba adormecida (conservación en frío); o bien condiciones ambientales desfavorables (ej., anabiosis por hambre, pH. no óptimo, etc.) (Bonadonna, 1989).

### 3) De retroceso

Lo presentan los espermatozoides cuyas colas se encuentran enroscadas sobre sí mismo. En general los movimientos de retroceso son rápidos o rapidísimos; a veces se establece alternándose con movimientos de quietud más o menos prolongados. Dicho movimiento está vinculado con una malformación caudal que no excluye la simultánea lesión cefálica, y por lo tanto los espermatozoides con esta cinética deben considerarse en estado de irreversibilidad. (Bonadonna, 1989).

Escala de valores:

5/5 80 a 100 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.

4/5 60 a 80 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.

3/5 40 a 60 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.

2/5 20 a 40 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.

1/5 20 o menos de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.

\*Valores aceptados como normales: 5/5 y 4/5.

Bloom señaló que en el semen bovino normal era esencial una motilidad del 40-45% o más, puesto que tasas más bajas se asociaban con infertilidad. Los toros más fértiles tienen un 50-80% de espermatozoides con activa motilidad progresiva.

### **Métodos computarizados del estudio del movimiento**

Desde hace varias décadas, varios investigadores han dedicado tiempo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Fruto de estas investigaciones fue el desarrollo de los sistemas computarizados para el análisis de la motilidad espermática. Desde los 80, los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se fue haciendo más accesible.

El sistema CASA consta de varias unidades independientes: un microscopio de contraste de fase conectado a una cámara de video, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada a un ordenador, de donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada

campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de un segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que pueden aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundos. Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los CASA, como por ejemplo:

**Análisis de motilidad:** establece una clasificación entre espermatozoides estáticos y móviles, y a su vez los móviles los clasifica según su trayectoria en progresivos y no progresivos.

**VCL (velocidad curvilínea):** distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo.

**VSL (velocidad rectilínea):** distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.

**VAP (velocidad media):** distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.

**LIN (índice de linealidad):** es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea.

**LIN:**  $(VSL/VCL) * 100$

**STR (índice de rectitud):** es la relación porcentual entre velocidad rectilínea y la velocidad lineal.

**WOB (índice de oscilación):** es la relación porcentual entre la velocidad lineal y la velocidad rectilínea.

**WOB:**  $(VAP/VCL) * 100$

Al final del proceso el CASA proporciona una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra, y la calidad media de ese movimiento. Pero además permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen, lo cual es una visión más real que la motilidad media de la muestra, puesto que una muestra de semen contiene una población heterogénea de espermatozoides. Esto explica, al menos en parte, que no se haya observado correlación entre parámetros medios y la fertilidad in vivo de una dosis seminal (Holt y Van Look, 2004).

### **Determinación de células vivas y muertas**

**Método:** colocar una gota de semen sobre un portaobjeto limpio, seco y entibiado a 37°C. A continuación (a ½ cm. aprox.) colocar 2 gotas de Eosina al 5 % y luego mezclar con el semen, con el extremo de una pipeta Pasteur. Con un segundo portaobjeto tocar

ambos extremos de la preparación, y en un tercer portaobjeto realizar frotis. Secar al aire y observar a mayor aumento.

Interpretación: las células coloreadas con eosina (rosadas) tienen alteradas la permeabilidad de su membrana plasmática, se consideran a estas células muertas; mientras que las sin coloración son consideradas células vivas.

#### **D) Determinación de anomalías espermáticas**

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra impidiendo la unión con el ovocito (Rodríguez-Martínez, 1999).

A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, desciende la capacidad fecundante del mismo. Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70 % (Barth y Oko, 1989) han de descartarse para la congelación.

Se han establecidos distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios: dependiendo su origen: testículo (primarias) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyacuación (secundarias) (Bloom, 1953; Barth y Oko, 1989) o si están asociadas a infertilidad o no (mayores o menores, respectivamente) (Bloom, 1977).

La que actualmente se utiliza en la cátedra de Teriogenología, es de acuerdo a la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal (Rep. Teriogenología).

Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad seminal. Por ejemplo si una dosis seminal tiene una motilidad individual entorno al 50%, y contiene 30% de espermatozoides con gota citoplasmática proximal, la alta incidencia de esta morfoanomalía repercute negativamente en la fertilidad de esa muestra, pese a la buena motilidad del eyaculado. Este defecto es muy común en toros jóvenes, los cuales se revierten cuando el toro crece y maduran sus órganos sexuales.

Otro defecto común son los espermatozoides con la cabeza de forma piriforme. Los espermatozoides con este defecto, poseen menor capacidad de unión y de penetración de la zona pelúcida, y si conseguían fecundar un ovocito, los cigotos resultantes tenían menor capacidad para iniciar su desarrollo, degenerando a las pocas horas.

Un grupo de anomalías de especial importancia son las que afectan al acrosoma, y entre las más frecuentes se han descrito el acrosoma nudoso y la membrana acrosomal aplanada. Los espermatozoides con acrosoma nudoso se encontraron en el eyaculado de sementales frisonos cuya espermatogénesis estaba alterada y se cree que es un defecto de origen congénito y hereditario (Barth y Oko, 1989).

Los eyaculados con espermatozoides con el acrosoma nudoso suelen presentar también otras anomalías espermáticas, lo que compromete aún más la fertilidad del semen. Se puede decir que los espermatozoides con este defecto son incapaces de atravesar las membranas que rodean al ovocito (Thundathil, 2002). Además se cree que es un defecto no compensable, es decir que los espermatozoides normales presentes en la muestra también tenían menor capacidad fecundante (Muiño, 2005).

Otra anomalía acrosómica es la membrana acrosomal aplanada. Se ha observado que eyaculados con alta incidencia de esta anomalía podía unirse normalmente a la zona pelúcida del ovocito, y su matriz acrosomal permanecía funcional (Meyer y Barth, 2001).

Las anomalías que afectan al núcleo espermático, como las vacuolas nucleares, suelen tener una menor incidencia. Thundathil en 1998, demostraron que los espermatozoides que presentaban este defecto nuclear se unían con dificultad a la zona pelúcida, pero eran capaces de penetrar el citoplasma del ovocito y fertilizarlo, y el embrión formado continuaba su desarrollo hasta la fase del blastocisto.

Otras anomalías frecuentes en semen bovino, como las colas enrolladas o los plegamientos de la pieza intermedia, si son abundantes en el eyaculado, pueden comprometer la fertilidad del toro, ya que los espermatozoides defectuosos no poseen una motilidad normal, y por tanto no van a poder alcanzar las proximidades del ovocito.

Siempre que aparecen anomalías en un eyaculado la fertilidad del semen puede verse comprometida, pero realmente no se sabe cuál es el porcentaje máximo de morfoanomalías espermáticas que puede ser compatible con una fertilidad normal. Lo que está demostrado es que existe una correlación negativa entre el número de formas anómalas y la fertilidad del semental (Barth y Oko, 1989; Januskauskas y Zilinskas, 2002).

## 1) Preparaciones secas.

### 1.1. Técnicas de contraste con Tinta China.

### 1.2. Técnicas de coloración de Williams.

Ambas técnicas están descritas pero se consideran obsoletas.

## 2) Preparaciones húmedas.

### 2.1. Técnica del formol salino buffereado.

Método: colocar en un tubo de ensayo con tapa 1 cc aproximadamente de solución de formol salino bufferado (+) y una gota de semen, ambas a igual temperatura. Mezclar bien los componentes. Colocar una gota entre porta y cubreobjetos y observar en contraste de fase de 400X y 1000X. Contar 200 células registrando las anomalías por su tipo.

Interpretación: la técnica se basa en el hecho que los espermatozoides son altamente transparentes a la luz; sin embargo causan cambios de fase que resultan de pequeñas diferencias en el índice de refracción y del grosor de las diferentes partes, se vuelven

más claramente detectables por este método. Esta técnica permite observar estructuras tales como el acrosoma, las membranas, etc.

Los sistemas computarizados también permiten realizar mediciones de las dimensiones de la cabeza espermática. Se conoce como sistema ASMA (Assisted Sperm Morphology Analysis), y están diseñados para realizar medidas del área, perímetro, longitud y anchura de las cabezas espermáticas presentes en una extensión de semen fijada y teñida. Es interesante disponer de los datos morfométricos de las dosis seminales, puesto que se ha comprobado que la morfometría anormal de las cabezas espermáticas influye negativamente en la fertilidad de los sementales bovinos. Para los análisis de morfología existen diferentes criterios de clasificación como pueden ser el de la O.M.S., Tygerberg (Kruger) o inclusive personal. Se pueden utilizar diferentes tinciones para una mejor visualización y captura de las imágenes: SpermBlue, Cell-VU (portas preteñidos) y Diff-Quik son los recomendados. También se utilizan Shorr, Papanicolau, etc. (Muiño, 2005).

Valores fisiológicos de anomalías en el toro:

Cabezas	3-18%.
Piezas medias	0-2%.
Colas	0-7%.
Gota proximal	0-5%.
Totales	15-20%. (Repartido Teriogenología 2008).

Saacke (1990) propuso clasificarlos en compensables o no compensables, según si el espermatozoide anormal puede o no vencer las barreras del tracto femenino y realizar la fecundación.

## **E) Concentración espermática**

El método más preciso para evaluar la concentración espermática del eyaculado es el recuento de espermatozoides. Este método, para uso rutinario en centros de inseminación, donde cada día se evalúan numerosos eyaculados y es necesario agilizar el trabajo, se hace laborioso y lleva tiempo (Boixo, 1996).

Normalmente en estos centros se opta por el uso del espectrofotómetro, que permite estimar de forma indirecta la concentración espermática basándose en la absorción o dispersión de la luz provocada por los espermatozoides en suspensión. La determinación de la concentración espermática mediante un espectrofotómetro es un método rápido y facilita resultados con un margen de error asumible (Catena y Cabodevilla, 1999).

El uso del hemocitómetro ha quedado relegado a un segundo plano, empleado fundamentalmente para obtener la curva de calibración del espectrofotómetro, o en laboratorios en los que se evalúa un reducido número de muestras de semen, o bien cuando este proceso se realiza de forma ocasional. (Muiño, 2005)

Contaje en cámara cuentaglóbulos con retículo de Thomas-Zeiss.

Método: cargar una pipeta Potin hasta la graduación 0.5 con materiales seminales y enrasar con soluciones de cloruro de sodio al 3%. Mezclar (agitando la pipeta 50 veces, sostenida en ambos extremos). Descartar las 2 primeras gotas sobre un papel de filtro, y secarla en su extremo inferior.

Colocar un cubreobjeto sobre los retículos y cargar la cámara tocando con un extremo de la pipeta ambos bordes del cubreobjetos en el lugar donde se contacta con los retículos (1 de cada lado). Contar las cabezas de los espermatozoides que se encuentran en 5 cuadrados mayores (leídos en diagonal preferentemente).

Aplicar fórmulas:           a)  $C = N \times 10.000$  (dilución 1/200).  
                                  b)  $C = N \times 5.000$  (dilución 1/100).

Valores fisiológicos para el toro:  $1.2 - 1.5 \times 10^9$  spz/mL (rep. Espermigrama terio)

### **G) Examen Viroológico y Bacteriológico del Material Seminal**

El examen bacteriológico y virológico de semen puede estar indicado en ciertas circunstancias, especialmente cuando hay signos de inflamación o infección genital en hembras luego del apareamiento con un macho, cuando hay una rápida declinación de la motilidad de los espermatozoides a raíz del almacenamiento, o se produce aumento del pH o la presencia de leucocitos o directamente pus en el eyaculado, o en el frotis de semen. Los microorganismos o agentes virales que aparecen en el semen pueden provenir de los testículos o los epidídimos, las glándulas accesorias, los conductos deferentes, la uretra, el prepucio o el pene. El examen de semen de los toros por métodos de cultivo o por inoculación de semen a animales de prueba puede revelar infección con brucelosis, tricomoniasis y vibriosis.

En vacunos la prueba de anticuerpos fluorescentes ha sido útil en el examen de muestras de esmegma prepucial para detectar vibriosis. En casos de brucelosis, las pruebas de aglutinación del plasma seminal pueden estar indicadas si el análisis de sangre revela un título positivo o sospechoso (Roberts, 1979).

Aparte del posible peligro para la hembra por introducción de la infección durante el acoplamiento, las bacterias y sus productos pueden lesionar a los espermatozoides y producir una rápida declinación de la motilidad de los almacenados, especialmente en semen diluido conservado (Roberts, 1979).

En toros, los microorganismos que pueden encontrarse en el semen incluyen: *C. renale*, *B. pyocyaneus*, *Leptospira* spp., *Estafilococos*, *E. coli*, *C. pyogenes*, *B. abortus*, *M. tuberculosis* (tipo bovino y avícola), *M. paratuberculosis* y *P. aeruginosa* principalmente (Roberts, 1979). Albertsen encontró micoplasma en el 94% de las muestras de semen de toros, quien fue que estableció que este microorganismo es un saprofito en el prepucio de casi todos los toros. (Roberts, 1979). Del semen de los testículos de toros se han obtenido virus que incluyen enterovirus, virus del fibropapiloma genital, virus de la fiebre aftosa), *Chlamydia*, virus de parainfluenza III, y de I.B.R – I.P.V. (Roberts, 1979).

MacPherson (1957), afirma que la congelación del semen para la conservación de los espermatozoides preservará también a la mayoría de los agentes infecciosos, incluso los virus. El nitrógeno líquido utilizado para el almacenaje de semen congelado puede llegar también a contaminarse con diversos microorganismos y virus, y ser así una fuente de infección para la vaca (Roberts, 1979). Los toros clínicamente infectados con enfermedad de Johne tienen, por lo común, el microorganismo en el semen. Tipos similares de microorganismos, así como los que producen enfermedades venéreas en cada especie, pueden hallarse también en otros machos (Roberts, 1979).

Al recoger muestras de semen para estudios bacteriológicos o virales es esencial observar prácticas sanitarias e higiénicas estrictas. Aunque el semen se recoge en una vagina esterilizada, por lo común se da cierta contaminación. Es imposible obtener una muestra de semen bacteriológicamente estéril en la vagina artificial o por electroeyaculación, debido a la contaminación por contacto con la uretra, el prepucio y el aire.

El método de tomar una muestra de secreción de las glándulas accesorias para cultivo consiste en protruir el pene y, luego de un cuidadoso lavado y desinfección del pene expuesto, del prepucio y la parte inferior de la uretra, se pasa una cánula esterilizada por la uretra y se recoge una muestra en un frasco esterilizado, masajeando las glándulas accesorias. En la actualidad esta prueba rara vez se realiza, excepto para determinar el agente causal de procesos inflamatorios del tracto reproductivo, o las glándulas accesorias (Roberts, 1979). Un relevamiento realizado sobre levaduras, se concluyó que el 13% de las muestras de semen a nivel comercial y un 71% de los lavados prepuciales de toros contenían levaduras. También se vio que las levaduras del prepucio eran saprofitas del género *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Trichosporon* (Boixo, 1996).

## **6) Manejo del Semen Bovino luego de su Obtención**

Según Foote (1967) el manejo del semen después de la recolección en vagina artificial debe ser cuidadoso, evitando: el shock por frío o sobrecalentamiento, la contaminación por agua, orina o agentes químicos, la excesiva agitación, y la exposición al aire o a la luz solar directa.

Si el semen no se va a diluir dentro de las 2 horas, se lo puede dejar en un recipiente pequeño y cerrado, en un lugar oscuro a la temperatura ambiente. El semen no diluido de toros fértiles puede usarse para inseminación artificial 24-36 horas después de obtenido. Para este propósito, se lo debe colocar en un recipiente pequeño y cerrado inmediatamente después de recogido, y el espacio de aire puede llenarse con un aceite mineral neutro de alta graduación.

El semen se enfría gradualmente colocando el frasco o tubo en un recipiente con agua a temperatura cercana a la corporal, de 26-32° C y poniendo ese recipiente en una heladera a una temperatura de 3-8° C; el semen debe mantenerse a esta temperatura hasta que se lo use o congele. Las tasas de concepción son bajas si el semen bovino no diluido se almacenó por 36 o más horas. Hay menos daño por shock por frío si antes de enfriarlo a 5 °C se le agrega un agente crioprotector o diluyente (Roberts, 1979).

## **Principios de Preservación de Semen**

Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la inseminación artificial (Holt, 2000).

Sin embargo, la reducción de la temperatura por debajo de los 37 °C y, principalmente, de los 20 °C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann y Pickett, 1987). El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15 y -60 °C (en el cual se producen los mayores daños) que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196 °C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130 °C no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

Para las células espermáticas, la tasa óptima de descenso de la temperatura oscila entre 10 y -100 °C/minuto, ya que velocidades superiores o inferiores provocan una disminución de la supervivencia (Rodríguez y col., 1975).

Cuando una suspensión de células se enfría a menos de 0° C, se forman cristales de hielo extracelulares, lo cual hace que los solutos se concentren en el agua líquida restante. La membrana celular actúa como una barrera que impide la diseminación de los cristales de hielo hacia el interior de los compartimentos intracelulares (Watson, 1979). Las sales no forman parte de los cristales de hielo, de modo que habrá una considerable concentración de sales en la porción remanente del agua no-congelada.

El aumento del gradiente osmótico a través de la membrana plasmática provoca la difusión del agua intracelular hacia el ambiente extracelular, causando deshidratación de la célula y de la membrana plasmática (Amann y Pickett, 1987).

Si se agregan crioprotectores como glicerol o dimetil sulfóxido al medio de congelación, es posible que retarde la deshidratación de las células, y el consecuente daño por el efecto de disolución (Hafez y Hafez, 2000). Por tanto, la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones ultraestructurales de la membrana, y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992).

Las células congeladas están sujetas a tensiones que resultan de las interacciones agua-soluto, que aumentan con la cristalización del agua. Durante la congelación, la exposición de células al medio hiperosmótico descongelado provoca la salida de agua intracelular, causando el encogimiento de la célula y la posible entrada de iones. La descongelación involucra una inversión de estos efectos, y el flujo de agua al interior de la célula puede causar ruptura de la membrana de la célula (Holt, 2000).

Existe una velocidad de enfriamiento óptima para cada tipo de célula, dependiendo de su tamaño, su relación de superficie-volumen, su permeabilidad al agua, y el coeficiente de temperatura de esa permeabilidad (De la fuente, 1999).

La congelación lenta permite una deshidratación celular progresiva que provoca un aumento de la concentración intracelular de solutos lo que impide la formación de cristales intracelulares. A medida que el medio extracelular se va congelando las células quedan atrapadas en canales de solución sin congelar, siendo los niveles de supervivencia espermática muy altos si permanece sin congelar alrededor del 15% del agua extracelular (Amann y Pickett, 1987).

En la congelación rápida, no hay tiempo suficiente para que se produzca el paso del agua intracelular al medio extracelular y por tanto la deshidratación. El agua que queda en el interior de la célula se congela en forma de pequeños microcristales que no dañan la célula.

Si bien la descongelación rápida minimiza el daño por efecto de la disolución, tal proceso hace que se formen grandes cristales de hielo que causan daños mecánicos graves. Por otro lado, la descongelación lenta impide la formación de grandes cristales de hielo, pero provoca mayores daños por efecto de la disolución. De este modo, la rapidez de descongelación óptima para un tejido dado depende de su tolerancia relativa al daño por cristales de hielo, y a la toxicidad por efecto de la disolución (Hafez y Hafez 2000).

Es, por tanto, importante que el logro de una longevidad celular máxima, requiera que el ritmo de descongelación esté en concordancia con el ritmo apropiado de congelación (Mazur, 1984). Si el ritmo de enfriamiento es rápido, el de calentamiento también lo debe ser; alternativamente, si el ritmo de enfriamiento es lento también debe serlo el de calentamiento. Las células que contienen micro-cristales de hielo intracelular deben ser recalentadas muy rápidamente a fin de evitar la re-cristalización de estos pequeños cristales, en grandes cristales que pueden dañar las células (Amann y Pickett, 1987).

El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación (Watson, 1995). Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hammerstedt y *col.*, 1990).

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen, es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico” (Foote, 2002). Dichas alteraciones se traducen en un patrón irregular del movimiento, pérdida de la motilidad, aumento de la permeabilidad de la membrana, disminución del metabolismo, pérdida de componentes intracelulares, y disminución de la producción energética (Watson, 1981).

El choque térmico provoca en las células otros efectos, como alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide, o “fases de transición lipídica” (Drobnis y *col.*, 1993). Otro factor también correlacionado con la susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico, es la ratio “colesterol/

fosfolípidos”, habiéndose observado que una ratio superior a 0,5 confiere una mayor resistencia al choque térmico.

Debido a este fenómeno, la refrigeración previa a la congelación se lleva habitualmente a cabo con mucha precaución, de modo que el enfriamiento se realiza lentamente, aunque esto no evita que los cambios de temperatura originen alteraciones en las membranas (Watson, 2000).

La susceptibilidad al choque térmico varía con las especies, considerándose los espermatozoides de toro y de cerdo entre los más sensibles, en los cuales se manifiesta por marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación dentro también  $\text{Ca}^{2+}$  y pérdidas de  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Por el contrario, los espermatozoides del hombre, aves, perro y conejo, no evidencian alteraciones tan marcadas.

Algunos constituyentes de la membrana espermática, son sumamente importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico, en tal caso, los fosfolípidos y los ácidos grasos. De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y carneros, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada ratio entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados, de aproximadamente 2,5-3,3. Mientras que espermatozoides de conejo y hombre presentan una ratio de 1 (Andrade Martins, 2005).

Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración, incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática y acrosómica, degeneración acrosomal, y lesiones en las mitocondrias.

La pérdida de las propiedades de selectividad en la permeabilidad de la membrana es uno de los hechos que más precozmente se producen en el proceso. Está asociada a las fases de transición de los lípidos de la membrana debidas al choque térmico (Watson, 1981). En el toro, la dilución y refrigeración a 5 °C provocan edema del acrosoma en el 50% de los espermatozoides (Andrade Martins, 2005). La actividad respiratoria del espermatozoide disminuye, así como la glucólisis, lo que provoca una reducción en los niveles de ATP y por ello, la pérdida de la motilidad.

En relación a los daños sufridos tras la congelación, la membrana plasmática y acrosomal son más sensibles que el núcleo y que la porción intermedia; y en el acrosoma, la membrana externa es más vulnerable que la membrana interna y que su contenido, es decir, que el acrosoma propiamente dicho.

En síntesis, podemos mencionar que los daños provocados por el proceso de congelación y descongelación son los siguientes:

\_ La **deshidratación celular**, que provoca un aumento de la permeabilidad no selectiva de las membranas celulares a consecuencia de cambios en la distribución de sus componentes, especialmente los lípidos, y la formación de “pliegues” en la membrana, debido a los cambios de volumen, que pueden llegar a producir el contacto y la eventual fusión entre membranas contiguas.

\_ **Aumento de la concentración de solutos** intra y extracelulares, los cuales pueden resultar tóxicos para la célula.

Estrechez de los canales de líquidos extracelulares no congelados, lo que impide la acomodación celular en los mismos, provocando la deformación y posibles lesiones celulares (Holt, 2000).

#### A) Diluyentes

Los requerimientos de los espermatozoides son, primariamente, para el mantenimiento de las funciones vitales para sobrevivir, incluyendo energía para su motilidad. Los espermatozoides deben estar vivos para ser fértiles, y la motilidad ha sido utilizada para determinar la viabilidad. La motilidad es sin embargo, un reflejo de la actividad flagelar y no necesariamente garantiza que esa célula sea fértil. La integridad del material genético en la cromatina del espermatozoide también debe ser preservada para lograr un desarrollo embrionario normal luego de la fertilización (Roberts, 1979).

Los diluyentes son compuestos químicos, o conjunto de sustancias que preservan la viabilidad y fertilidad del semen, a la vez que posibilitan el procesamiento de un número previamente establecido de espermatozoides, acondicionados en envases adecuados, de un tamaño conveniente para la inseminación (Cavestany, 1994).

La concentración de espermatozoides en un eyaculado de un toro normal es considerablemente alta, lo que posibilita que pueda ser utilizado para inseminar cientos de vacas. Es necesario, por lo tanto, realizar una dilución o extensión del mismo para proveer una dosis de inseminación conveniente, que contenga un suficiente número de espermatozoides de modo de asegurar un máximo porcentaje de fertilización, sin desperdiciar espermatozoides. Al mezclar espermatozoides con diluyentes (extensores), se agregan muchos ingredientes que los mantienen y protegen, preservando por lo tanto su fertilidad hasta el momento de la inseminación.

#### ***Funciones de un Diluyente:***

- a) Proveer nutrientes a los espermatozoides, como fuente de energía.
- b) Proteger los espermatozoides contra los efectos dañinos de un enfriado rápido.
- c) Proveer un buffer para prevenir efectos nocivos de cambios de pH al formarse ácido láctico, resultante del metabolismo de la glucosa por los espermatozoides.
- d) Mantener una presión osmótica y un balance electrolítico adecuado.
- e) Inhibir el crecimiento bacteriano.
- f) Aumentar el volumen de semen de modo que pueda ser utilizado para múltiples inseminaciones.
- g) Proteger los espermatozoides del congelado.

#### **Tipos de Diluyentes**

##### ***a) Generalidades***

Hay incontables medios que preservan los espermatozoides:

- soluciones salinas fisiológicas
- glucosa
- sulfatos

- lecitinas y peptonas que también pueden proteger la membrana lipídica del espermatozoide.

Ninguno de estos medios, sin embargo, extiende la vida de los espermatozoides. El mayor avance en diluyentes de semen surgió con el descubrimiento de la yema de huevo (1939), así como el mayor avance en la congelación de semen surgió con el descubrimiento del glicerol (1949) (Cavestany, 1994). En la fórmula original, el diluyente contenía volúmenes iguales de yema de huevo y fosfato bufferado. Luego se descubrió que si se reemplazaba el fosfato por citrato de sodio se mantenía la misma fertilidad, a la vez que mejoraba la motilidad y la visibilidad (lo que hacía posible una mejor evaluación microscópica). Dada la gran variedad de diluyentes existentes, cada laboratorio (o cada profesional especializado) debe determinar qué diluyente, bajo sus condiciones, provee un máximo de eficiencia reproductiva.

Considerando varios factores, como preparación del diluyente, costo de los materiales y la temperatura ambiente de trabajo Thun y col. (2002) afirman que el uso de TRIS-yema de huevo y el RT como método de almacenamiento, producen la mejor calidad del semen, y los mejores índices de concepción en el campo.

### ***Componentes Básicos de un Diluyente:***

#### **1) Agua Destilada**

Actúa como solvente para los componentes seminales y del diluyente. Debe ser destilada (o mejor aún, bi-destilada) para eliminar la presencia de metales pesados en solución, los que son dañinos para el espermatozoide.

Los diluyentes deben ser formulados no solamente de manera que prevengan la formación de productos tóxicos durante el almacenamiento, sino que además deben estar libres de sustancias que pueden ser dañinas para los espermatozoides.

Agentes crioprotectores como el glicerol son algo tóxicos, y los espermatozoides muertos son una fuente de aminoácido oxidada, que es dañina para las células.

Es posible la producción de  $H_2O_2$  en los diluyentes, por lo tanto deben ser formulados de manera que prevengan la formación de la misma.

La dilución de espermatozoides, particularmente en medios sintéticos, declina su motilidad en relación directa a la tasa de dilución. Las causas de este “efecto de dilución” parecen ser debidas a una pérdida de componentes del espermatozoide en presencia de un medio muy diluido. Por otra parte, el semen debe ser mezclado con una cantidad suficiente de diluyente de manera que la concentración inicial de espermatozoides sea diluida hasta llegar a un número deseado de espermatozoides en una dosis inseminante. Se deben agregar, por tanto, agentes protectores tales como macromoléculas presentes en productos naturales, así como yema de huevo o leche, para así reducir o eliminar este “efecto”.

#### **2) Sustancias Buffer y no Iónica (disueltas para mantener la osmolalidad y el pH del medio)**

Entre éstas se encuentran:

**Citrato de sodio** (dihidrato) es un compuesto químico que, por lo general, se refiere al ion del citrato unido a tres átomos de sodio: el citrato trisódico. Sin embargo, puede tratarse también del citrato monosódico o del citrato disódico cuando el citrato se encuentra unido a uno o dos átomos de sodio respectivamente. Químicamente, los citratos de sodio son sales sódicas del citrato también llamado ácido cítrico que es un componente común de las células del cuerpo humano. El citrato disódico tiene la fórmula química  $\text{Na}_2\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$  y se usa como antioxidante para preservar los alimentos así como para mejorar el efecto de otros antioxidantes. También se emplea como regulador de acidez y como compuestos aromáticos (Wikipedia, 2010).

**TRIS**, que es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris (hidroximetil) aminometano, de fórmula  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ . Se utiliza ampliamente en bioquímica y biología molecular. El TRIS tiene un pka de 8.06, lo que le aporta capacidad tamponante efectiva en un intervalo de pH entre 7.0 y 9.2. El pka disminuye aproximadamente 0.03 unidades por cada grado centígrado de incremento de temperatura. La forma de uso más frecuente se llama Tris base (es la forma básica, no ionizada, de la amina); en ocasiones se utiliza también la forma ácida o hidrocloreto (Tris-HCL). Para ajustar el tampón a un pH específico se puede usar  $\text{OH}^-$  para Tris HCL o  $\text{H}^+$  para Tris base, o bien mezcla de dos soluciones Tris- HCL y Tris base hasta que el pH sea el deseado. El resultado es equivalente en los 3 casos, pero para conseguir la concentración esperada de tampón debe tenerse en cuenta que las masas moleculares de las formas básicas y ácidas (hidrocloreto) son diferentes. El intervalo de tamponamiento del Tris (7-9) coincide con el pH fisiológico de la mayoría de los seres vivos. Sumado a su bajo costo, esto hace del Tris uno de los tampones más comunes en laboratorios de biología y bioquímica (Wikipedia, 2010).

**TES:** N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic Acid

**TEST** (TRIS + TES)

**Glutamato monosódico** es la sal sódica del aminoácido ácido glutámico (o glutamato) que se encuentra de forma natural en numerosos alimentos como los tomates, setas, verduras, proteínas e incluso la leche materna. No es un aminoácido esencial pero es la principal fuente de energía del intestino. Su sal purificada, obtenida por fermentación de la caña de azúcar o algunos cereales, también se utiliza como condimento para potenciar el sabor de los alimentos y se conoce con el nombre de E621, proteína hidrolizada o extracto de levadura. (Wikipedia, 2010).

- **Diferentes buffers** con combinaciones de soluciones salinas o carbohidratos

- **Preparaciones a base de leche**

Los espermatozoides deben ser protegidos contra una autointoxicación debido a productos ácidos (ácidos lácticos) derivados de su metabolismo.

La motilidad y fertilidad se preservan bien en yema de huevo y leche con pH neutro, aunque una reducción del pH a 6.5 puede resultar beneficioso (Salisbury, 1978).

La osmolalidad (número de partículas suspendidas como solutos en una solución) influencia no solamente la presión osmótica de una solución, sino el punto al cual el solvente se congela. Por lo tanto, la disminución del punto de congelación de una solución refleja su concentración osmolal. Una concentración osmolal de un soluto en agua disminuye su punto de congelación 1.86° C. La depresión del punto de congelación del semen de toro es aproximadamente -0.55° C, equivalente a una concentración de +- 300 miliosmoles, que aumenta cuando el espermatozoide metaboliza nutrientes. Por lo tanto, es preferible errar hacia el lado de la hipotonía que el de la hipertonía en un diluyente.

Los espermatozoides se comportan como osmómetros y son capaces de grandes cambios de tamaño, dependiendo de la tonicidad del medio en que se encuentran. El plasma seminal tiene una presión osmótica de miliosmoles y se asume que representa la presión osmótica ideal. Aun en ese caso, no debe asumirse que soluciones de presión osmótica equivalente, medida por pruebas físicas, sean isotónicas con el espermatozoide, ya que la permeabilidad de la célula a diferentes sustancias varía. Pueden haber interacciones entre la concentración total de sustancias en el líquido que rodea al espermatozoide, el pH del medio, e iones específicos y electrolitos presentes. Si la tonicidad del medio se desvía considerablemente, los espermatozoides pueden mostrar las colas dobladas, nadar en círculos y morir. Afortunadamente, los espermatozoides pueden tolerar una variación moderada de tonicidad sin perder fertilidad. El grado de tolerancia está afectado por interacciones con el pH y otros iones presentes. Los diluyentes elaborados para preservar el semen deben ser isotónicos, bajo las condiciones de su empleo, para no causar daños morfológicos o funcionales.

### **3) Materiales Orgánicos**

Tienen la capacidad de prevenir el shock de frío (yema de huevo o leche). En algunos compuestos, se han estandarizado las proporciones, tal es el caso de la yema de huevo en los diluyentes comerciales de toros, sea de un 20% (Amirat y col., 2004).

Recientemente, se han impuesto barreras sanitarias que impiden que la yema de huevo se siga usando como subproducto de origen animal, principalmente cuando el material es distribuido hacia otros países. Para el comercio internacional se ha propuesto el uso de diluyentes con aditivos naturales, como la lecitina de soja (Jimenez y col., 2004).

En estudios recientes, se ha informado de los riesgos de contaminación microbiana que representa el uso de yema de huevo (Thun y col., 2002). Jimenez y col. (2004), aunque reconocen los efectos beneficiosos de la yema de huevo para la preservación espermática, están de acuerdo en que representa un riesgo potencial de contaminación microbiana para las demás células, afectando la calidad de la muestra.

Mousa y col. (2002), y Amirat y col. (2004), consideran que la creciente demanda para reemplazar la yema de huevo como componente del diluyente, es debido a la presencia de sustancias en la yema que inhiben la respiración de los espermatozoides, disminuyendo su motilidad. Se han podido observar grandes beneficios cuando se eliminan estas sustancias nocivas de la yema de huevo, y se adiciona exclusivamente ese agente crioprotector.

Se ha llegado a la conclusión de que la fracción de las lipoproteínas de baja densidad, es la principal responsable del efecto criopreservante en la yema de huevo.

Watson (1979) propuso que los espermatozoides son protegidos por un recubrimiento reversible y sugirió que las proteínas de la fracción lipoproteína se unen a la superficie de la membrana, evitando la pérdida de fosfolípidos de membrana durante la criopreservación.

Se ha sugerido recientemente que las lipoproteínas de la yema de huevo protegen a los espermatozoides durante la congelación-descongelación, debido a que estas se unen a las proteínas del plasma seminal presentes en el semen, secuestrándola en su mayoría, y por tanto, impidiendo su efecto negativo sobre la membrana espermática.

Se han realizado estudios, como los de Mousa y col. (2002) y Amirat y col. (2004), en los que se describe una técnica para la purificación de la yema de huevo por ultracentrifugación en un gradiente de densidad. De esta forma se obtiene la fracción denominada "Low-Density Lipoprotein" (LDL), y han realizado esfuerzos para probar si la fracción LDL tiene las mismas propiedades protectoras que la yema de huevo entera.

La mayoría de los estudios reportan un efecto positivo sobre la motilidad del semen, ya que la proteína de baja densidad actúa muy bien como amortiguador. Amirat y col. (2004) estudian y comparan la fertilidad después del proceso de congelación y descongelación utilizando yema de huevo entera en diluyente comercial (OptidylR) o LDL, encontrando que no existen diferencias significativas entre ambos, por lo que concluyen que la LDL puede ser utilizada para la conservación de semen.

Mousa y col. (2002), en ensayos realizados con diluyentes comerciales a base de yema de huevo (TriladylR 20% YH), demostraron que tanto la motilidad como las características del semen descongelado mejoran con una alta significancia para LDL. En cuanto a la concentración óptima de LDL, los mejores resultados de motilidad espermática se obtienen cuando se utiliza el LDL al 8% (Mousa y col., 2002).

En el caso de la leche (que puede ser entera o descremada), la caseína es la sustancia responsable de la protección contra el shock de frío. Cuando se utiliza leche en un diluyente, ésta debe ser calentada por encima del punto de pasteurización, para destruir la lactenina que es espermicida (los grupos sulfóxido liberados al calentar la leche, probablemente eliminan este factor tóxico). El procedimiento adecuado consiste en calentar la leche hasta 92-95 °C por 10 minutos, dejando enfriar y repitiendo la operación un par de veces más (tyndalización) (Salisbury, 1978). A los efectos prácticos, puede ser utilizada la denominada "leche larga vida" o leche en polvo reconstituida, ya que el proceso de preparación de ambas incluye un calentamiento adecuado para la destrucción de la lactenina.

#### 4) Agentes Crioprotectores

El glicerol es el crioprotector más utilizado en los protocolos de congelación en todas las especies domésticas. Su descubrimiento como agente crioprotector se debe a Polge y colaboradores y ha marcado un avance notable en la preservación del semen, por medio de la congelación. Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los

compartimentos extra e intracelulares (Mazur, 1984). Sin embargo, Amann y Pickett (1987) sugieren que su principal efecto crioprotector se ejerce a nivel extracelular.

El glicerol aumenta la osmolaridad del medio externo, disminuye la concentración de sales, y aumenta el agua extracelular sin congelar a bajas temperaturas, aumentando los canales de agua descongelada (Amann y Pickett, 1987). Los efectos sobre la osmolaridad celular no son los únicos, el glicerol también parece ejercer un efecto directo en la permeabilidad de la membrana plasmática, disminuyendo su fluidez al formar uniones con las proteínas (Parks y Graham, 1992).

Por otra parte, existe consenso en que a pesar de que el glicerol protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, también ejerce una cierta toxicidad celular, que afecta a la membrana plasmática (Hammerstedt y col., 1990).

Las alteraciones resultantes pueden mermar la fertilidad del espermatozoide, aunque tenga motilidad tras la descongelación (Watson, 1979) y seguramente una adecuada producción de energía, ya que puede afectar a otros aspectos importantes (Amann y Pickett, 1987).

La sensibilidad a los efectos tóxicos del glicerol varía considerablemente con la especie. La concentración óptima para una determinada especie representa siempre un compromiso entre los efectos protectores y los efectos tóxicos (Watson y col., 1979).

Por otra parte, la preservación de la motilidad y la integridad de las membranas (plasmática y acrosomal) exigen concentraciones de glicerol ligeramente distintas.

En la congelación de semen de rumiantes como el bovino, ovino y caprino, la totalidad de los trabajos publicados utilizan el glicerol como el crioprotector principal, con una concentración óptima del 7% (Watson, 1979; Watson, 1995). La concentración óptima de glicerol para la congelación de semen bovino está también influenciada por otros componentes en el diluyente (Woelders, 2003). Basta decir que las concentraciones de glicerol para la congelación han sido entre 0,25 M (2,25%) y 1 M (9%), con muchos estudios que demuestren la toxicidad más allá de esta concentración (Fahy, 1986).

### Tipos de crioprotectores

1) Crioprotectores permeables de bajo peso molecular: Glicerol, etilenglicol, 1.2 propaneíol, DMSO, 2.3 butaneíol, metanol, otros alcoholes.

2) Crioprotectores no permeables de bajo peso molecular: Galactosa, Glucosa, Sacarosa, Tretalosa, Lactosa, Manosa, otros azúcares.

3) Crioprotectores no permeables de alto peso molecular: Polivinilpirrolidona, Alcohol Polivinílico, Almidón Hidroxietílico, Hialuronidato de Sodio, otros polímeros.

Los crioprotectores no permeables, no penetran la membrana plasmática, y ejercen su acción en el medio externo. Estos azúcares realizan su efecto en el porcentaje de agua sin congelar a bajas temperaturas, y disminuyendo la concentración de sales en los canales de agua (Amann y Pickett, 1987).

El DMSO (dimetilsulfoxido) o el glicerol, penetran de forma rápida a través de la membrana plasmática del espermatozoide, llegando al interior del citoplasma celular, ejerciendo su acción protectora, reemplazando el estrés osmótico provocado por la deshidratación, aunque manteniendo el volumen, y disminuyendo el punto de congelación.

Los crioprotectores no penetrantes de elevado peso molecular actúan osmóticamente, promoviendo la deshidratación celular durante la congelación, e impidiendo la formación de grandes cristales de hielo en el interior de las células (Watson, 1995). Estos agentes no atenúan el efecto de la alta concentración intracelular de solutos (efecto solución), y, por tanto, son más efectivos en congelaciones rápidas.

#### 5) Azúcares

Los monosacáridos (glucosa y fructosa) son azúcares de los cuales el espermatozoide puede obtener energía para sus procesos vitales. También actuarían como sustitutos de electrolitos, manteniendo el balance osmótico del diluyente.

Di y Tri sacáridos, los cuales no pueden ser metabolizados por el espermatozoide, proporcionan algo de acción crioprotectora, principalmente como moléculas relativamente grandes que contribuyen a mantener un balance osmótico, actuando como sustitutos de electrolitos (Salisbury, 1978). No son capaces de penetrar la membrana espermática y probablemente disminuyen los efectos de la concentración de solutos durante la congelación y la descongelación. Proporcionan mejores resultados cuando se agregan al semen en la fracción glicerolada antes de la congelación, y no están presentes en la primera fracción del diluyente. Para el congelado de pellets (pastillas), donde la tasa de congelado es rápida, estos azúcares reemplazan efectivamente las sales bufferadas de los diluyentes.

El requerimiento principal de energía del espermatozoide es para mantener la motilidad, pero se requiere energía adicional para el mantenimiento celular. Los espermatozoides tienen capacidad tanto de metabolismo aeróbico como anaeróbico. Una simple fuente de energía, como fructosa o glucosa (que son capaces de penetrar al espermatozoide) se debe adicionar al diluyente para proteger las reservas intracelulares del espermatozoide (la fructosa presente en el plasma seminal se diluye considerablemente con la extensión).

En ausencia de un sustrato simple como los mencionados, los espermatozoides pueden oxidar fosfolípidos intracelulares, lo que resulta nocivo para la célula. La yema de huevo y la leche contienen glucosa así como otros componentes utilizados por el espermatozoide.

#### 6) Aditivos

Para Hafs y col. (1969), el agregado de 1 ug de B-amilasa por ml de diluyente, aumenta la fecundidad en un promedio de dos puntos de porcentaje y con el agregado de 10 µg de alfa-amilasa, el aumento es de 1-4 puntos. Hafs y col. (1969) agregaron también al diluyente B-glucuronidasa, el cual proporcionó los mejores resultados de fecundación. Por otro lado, Lindorf (1973) utilizó enzimas hidrolíticas como la B-amilasa y B-glucoronidasa en el diluyente del semen bovino destinado al congelado. El autor empleó según el caso, B-amilasa, B-glucoronidasa, o bien una u otra enzima juntas. El material

seminal se conservó en pajuelas donde los resultados de no retorno al celo luego del servicio fueron: (a) sin enzimas: 63.1%, (b) con B-amilasa sola: 64.9%, (c) con B-glucuronidasa: 65.1%, y (d) con ambas enzimas: 67.2%. Según el autor, no existe interacción entre las dos enzimas, aunque sí efecto aditivo. Sin embargo, aún se debe aclarar el mecanismo de acción de dichas enzimas. Por su parte, Shannon (1962) obtuvo una prolongación de la vida de los espermatozoides y una mayor fertilidad, agregando al diluyente ácidos volátiles (ej., acético, propiónico, butírico, valeránico, caproico, caprílico u octunoico) por separado. Diversos autores probaron agregar vitaminas A, B, C, D, tiroxina, antihistamínicos, etc. (Bonadonna, 1989).

Según un estudio realizado por Pereira y col. (2010), quienes probaron el efecto de la heparina (5 UI), cafeína (5 mM) y ionóforo de calcio A23187 (0,1 mM) sobre la motilidad y la reacción acrosomal in vitro, en semen tanto de toro como de chivo. Se realizó una filtración en lana de vidrio reforzada, la proporción de espermatozoides móviles fue del 43% al 62% de las especies bovina y de 41% a 60% en los caprinos. El efecto de la incubación con heparina, cafeína, y ionóforo de calcio sobre la motilidad del espermatozoide fue insignificante. El tratamiento del semen con el calcio-ionóforo resultó en un porcentaje significativamente mejorado de los espermatozoides vivos con reacción acrosómica verdadera en todas las etapas de incubación, tanto en las especies bovina y la caprina.

## 7) Antibióticos

Muchos países exigen que todo el semen importado de terceros países deba de ser tratado bajo un procedimiento de antibióticos. Normalmente la Normativa Europea (84/407) exige tratar el semen de toros con cuatro diferentes antibióticos (Lincomicina, Espectinomina, Tilosina, Gentamicina) (Vallecillo, 2011).

La yema de huevo, así como otros medios, proporcionan un buen ambiente para el desarrollo de microorganismos, los que a su vez producen productos que pueden ser dañinos para los espermatozoides, y que pueden infectar las hembras. Algunos organismos se encuentran en el semen de toros sanos aún en condiciones asépticas de colección y procesamiento. Es, por tanto, una práctica común y adecuada, incluir antibióticos tales como penicilina y estreptomina en los diluyentes (Salisbury, 1978). Los resultados indican que el agregado de antibióticos al diluyente antes del congelado fue benéfico no solo para el control bacteriológico, sino que tuvo un efecto biológico positivo en las muestras tratadas.

El agregado de antibióticos al semen de toros de baja fertilidad mejoraba su tasa de concepción en un 10-15%, con lo cual se pudo lograr esta mejoría de las tasas de concepción por causa de un mejor control del desarrollo bacteriano (Roberts, 1979; Maule, 1962). Un trabajo realizado sobre el efecto control de las diferentes mezclas de los antibióticos por Shin y col. (1988), afirma que la combinación de gentamicina (500 ug/ml), tylosina (100 ug/ml) y lincomicina-espectina (300/600 ug/ml), fue más efectiva para el control de micoplasma y ureoplasma, y mantuvo igual efecto control sobre campilobacter y haemophilus que la clásica combinación entre penicilina, dihidroestreptomina y polimixina B sulfato.

A su vez los niveles excesivos de antibióticos en el semen pueden ser tóxicos por los espermatozoides, y las cantidades superiores a las recomendadas no producen ningún beneficio adicional (Roberts, 1979).

## 8) Antioxidantes

Un antioxidante con función biológica se define como una sustancia que disminuye o evita la oxidación del sustrato, resultando un agente reductor más potente.

Los espermatozoides del epidídimo son protegidos de los agentes reactivos del O<sub>2</sub> que pueden perjudicar el complejo proceso de maduración. La protección radica en cinco enzimas principales (Tramer y col., 1998): glutatión peroxidasa (GPx), fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Las enzimas intracelulares SOD, CAT y GR inhiben el daño oxidativo. La disminución en los niveles de esta enzima en los espermatozoides del hombre está asociada con infertilidad (Imai y col., 2001). El glutatión reducido es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide de carneros y equinos, funciona en una variedad de importantes procesos fisiológicos y metabólicos en todas las células de mamíferos, incluyendo la desintoxicación de los radicales libres, metales y otros compuestos electrofílicos.

Para intentar minimizar la peroxidación se han ensayado diversos antioxidantes, examinando sus efectos sobre los espermatozoides. En el carnero se han analizado los sistemas enzimáticos superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y citocromo C líquido (CHc), antioxidantes que han mejorado la movilidad y la integridad acrosomal del espermatozoide (Maxwell y Stojanov, 1996).

La preservación de semen líquido a 5° C es una técnica utilizada en el manejo reproductivo de los equinos, y el daño oxidativo en los espermatozoides durante el almacenamiento es una causa potencial en la disminución de la movilidad y fertilidad, por lo que se ha evaluado el efecto de adicionar antioxidantes solubles en agua y solubles en lípidos para mantener la movilidad.

Entre las moléculas antioxidantes se ha mencionado repetidamente a la melatonina, aunque bajo ciertas circunstancias también puede ser pro-oxidante (Guzmán-Grenfell y col., 1999). La melatonina inactiva a radicales altamente reactivos como es el caso del radical -OH, el singlete de O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO y el anión peroxinitrito. Además estimula las diversas enzimas antioxidantes. De la misma manera, la albúmina sérica representa el principal y predominante antioxidante en el plasma. En cuanto al aporte exógeno de estos compuestos; el sistema de defensa antioxidante derivado de los componentes de la dieta comprende a las vitaminas E y C, el β-caroteno, el retinol y los carotenoides, que son poderosos antioxidantes (Schuneman y col., 2001). Las vitamina C y especialmente la vitamina E disminuyen el grado de peroxidación lipídica. En los últimos 10 años la función celular antioxidante del α-tocoferol ha sido ampliamente investigada. Además de la vitamina E, se ha evaluado el butil-hidroxitolueno (Sommer y col., 2000) en espermatozoides de pavo durante el almacenamiento líquido, logrando un mejoramiento en la integridad de la membrana, en la movilidad y en la sobrevivencia espermática.

La vitamina C o ácido ascórbico es el principal antioxidante en el plasma y dentro de la célula, al donar electrones al radical tocoperóxido de la vitamina E oxidada; de esta manera recicla la función antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol, ayudando a proteger la membrana lipídica de la peroxidación. Se le ha utilizado para prevenir el efecto oxidante de las lipoproteínas de baja densidad (Carr *y col.*, 2000a).

En semen equino, la vitamina C ha tenido efectos protectores sobre la integridad de la membrana de espermatozoides almacenados a 5° C; sin embargo, no mejora significativamente el mantenimiento de la movilidad (Ball *y col.*, 2001b). En el pavo tampoco ha tenido efectos benéficos sobre las características seminales. Por otra parte, las proteínas aisladas del plasma seminal de carnero revierten los daños causados por el choque por frío, aumentan la proporción de membranas intactas de los espermatozoides y se repara el daño causado, restaurándose la permeabilidad de la membrana plasmática. De la misma manera, una fracción del plasma seminal de equino contiene fosfocaseinato y parece estar implicada en una actividad antioxidante (Batellier *y col.*, 2001).

Los compuestos como los carotenoides y el  $\alpha$ -tocoferol son antioxidantes lipofílicos de la dieta que protegen a las lipoproteínas plasmáticas contra la oxidación (Schunemann *y col.*, 2001). Sin embargo, como ya se mencionó la adición de  $\alpha$ -tocopherol al semen equino a 5° C no reduce la peroxidación.

El  $\alpha$ -tocoferol puede actuar como un antioxidante o pro-oxidante, ya que inhibe o facilita la peroxidación lipídica de las lipoproteínas de baja densidad. La actividad pro-oxidante del  $\alpha$ -tocoferol es prevenida por el ascorbato, por lo que la vitamina E solo puede ser efectiva en combinación con la vitamina C. La combinación de la vitamina E, un antioxidante lipofílico, con vitamina C, un antioxidante hidrofílico, y/o selenio, desintoxica los lípidos de los peróxidos (Schwenke y Behr, 1998).

## 9) Minerales

El agregado de  $Mn^{++}$ , durante la criopreservación mostró efecto protector, a su vez los mismos fueron directamente proporcionales, a mayores niveles de  $Mn^{++}$ , mejores aun fueron los parámetros de calidad del semen (Cheema *y col.* 2010). Por su parte el agregado de  $Mn^{++}$ , a la mezcla yema de huevo, citrato, glicerol, mejoran los resultados de fecundación *in vitro* y por ende también los niveles de concepción en inseminación artificial (Cheema *y col.* 2010).

Según Kilic, el líquido seminal de pacientes con hipomotilidad exhibieron una concentración de  $Ca_2$  significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en comparación con la de los pacientes con la motilidad normal y el conteo de espermatozoides. Este estudio sugiere una relación directa entre la movilidad y los niveles de  $Ca_2$  en el espermatozoide. (Kiliç *y col.* 2010).

## Diluyentes comerciales a nivel mundial

Para congelar semen de toros:

\_ BILADYL®: Distribuido por Minitub Germany. Consiste en dos fracciones A y B por paso, con una composición de TRIS, ácido cítrico, glucosa, 20% yema de huevo, 7% glicerol, agua y antibióticos.

concentración espermática es generalmente más alta. Aunque de calidad más variable, el semen colectado por electroeyaculación puede congelarse sin problemas, y su fertilidad es tan buena como la del semen obtenido por vagina artificial. Una vez colectado, el semen debe ser manipulado con cuidado para evitar shock térmico, y diluido utilizando procedimientos adecuados.

- B. Eyaculados conteniendo menos de 50% de espermatozoides móviles o más de 30% de espermatozoides anormales deben ser descartados, aunque en algunos casos especiales podría ser congelado.
  
- C. En la producción comercial de semen bovino congelado, el número mínimo de espermatozoides por pajuela necesario para obtener la máxima capacidad fecundante se ha establecido en 15 millones, con lo menos el 50 % de motilidad progresiva post-descongelación (Van Lieshout, 1995). No obstante los centros de inseminación exceden este número mínimo establecido, intentando garantizar la presencia de al menos 10 millones de espermatozoides vivos y con motilidad progresiva en cada dosis seminal.

Este número mínimo, para algunos sementales excepcionales, probablemente puede ser reducido hasta 5 o 6 millones de espermatozoides vivos por dosis sin un descenso significativo en la fertilidad (Januskaukas, 1996). A partir de este mínimo establecido, por más que se incremente la concentración espermática de la dosis seminales no se va a reflejar en un aumento de la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 2002).

### ***3.-Procesamiento en Pajuelas***

#### **A.-Cálculo de Dilución**

##### **1.- Determinación de la Concentración.**

La concentración de semen se puede calcular por contaje en cámara cuenta-glóbulos, realizando una dilución del semen de 1:100, o mediante el empleo de un espectrofotómetro, previamente calibrado.

##### **2.-Determinar el Número de Dosis que se puede Obtener.**

Información necesaria:

- a) total de espermatozoides del eyaculado (volumen \* concentración)
- b) número de espermatozoides deseados por dosis.

Dividiendo a/b, se obtiene el número de dosis.

##### **3.-Determinar el Volumen de Diluyente Requerido.**

Información necesaria:

- A) número de dosis
- B) volumen de dosis

### C) volumen de semen

Multiplicando A\*B se obtienen el volumen de semen diluido.

Restando a ese total el volumen de semen, se obtiene el volumen de diluyente necesario (Cavestany, 1994).

Ejemplo:

1.- concentración: 1.200 millones de espermatozoides por cc.

2.- volumen: 5 cc de semen.

3.- total de espermatozoides por eyaculado:  $1.200 * 5 = 6.000$  millones.

4.- número de espermatozoides por dosis:  $30 * 10$  millones

5.- número de dosis:  $6.000$  dividido  $30 = 200$

6.- volumen de diluyente: número de dosis por volumen de dosis:

$$200 * 0.5 = 100 \text{ cc de semen diluido}$$

$$100 - 5 = 95 \text{ cc de diluyente.}$$

Ejemplo de congelación en dos tiempos:

Este tipo de procesamiento consiste en agregar la mitad del diluyente sin glicerol (fracción a) antes del enfriado, y agregar la segunda mitad, ésta con glicerol (fracción b) en algún momento durante la equilibración (esta fracción debe contener el doble de la concentración final deseada de glicerol). La fracción b se puede agregar al semen de diferentes maneras (Cavestany, 1994).

Normativa para el Mercosur:

- 1) Volumen de la dosis 0,25 mL.
- 2) Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales con movimiento progresivo al descongelado mayor al 30%.
- 3) Vigor mayor a 3.
- 4) Número de espermatozoides morfológicamente normales con movimiento progresivo al descongelado mayor a 6 millones, sugiriéndose un mínimo de 10 millones.

Para las dosis con 6 a 10 millones de espermatozoides, el número total de anomalías espermáticas no será superior al 20%, y los defectos mayores, no mayor al 10%. Para dosis superiores a 10 millones de espermatozoides normales con motilidad

progresiva, el número total de espermatozoides anormales no será mayor al 30%, defectos mayores y menores del 20%. **(Decreto 165/000, de 31 de mayo de 2000).**

Retomando el ejemplo anterior, tenemos que es necesaria la adición de un total de 95 cc de diluyente.

- fracción A: eyaculado 5 cc
- Diluyente 45 cc
- Total 50 cc

(Esto representa la mitad del volumen final de semen diluido)

-fracción B: glicerol 7cc ( $100 \times 0.07$ )

Diluyente 43 cc

Total 50 cc

Enfriar ambas fracciones hasta 5 °C, colocadas en baño María en el refrigerador. Luego de alcanzar esa temperatura (unas 4 horas), agregar la fracción B. Envasar y congelar (Cavestany, 1994).

#### **B) Enfriado:**

1.- durante la colección o la dilución inicial, el semen debe mantenerse a 35-37 °C. El diluyente también debe mantenerse a la misma temperatura (hay quienes aconsejan bajar la temperatura del semen y diluyente a 27-30 °C).

2.-luego de la primera dilución, el semen se enfría lentamente, durante 3-4 horas hasta llegar a 5 °C (la primera dilución consiste en agregar la mitad del diluyente necesario usualmente “fracción A”, o fracción sin glicerol).

3.- el enfriado lento se puede conseguir colocando el tubo o frasco de semen dentro de un recipiente de unos 600 cc con agua a 37 °C

#### **C) Glicerolización: (adición de glicerol)**

1.- si se utiliza la dilución en un paso, el total del diluyente necesario (junto con el glicerol) se agrega antes del enfriado, por lo que esta etapa no se realiza.

2.- con una dilución en dos etapas, la “fracción B”, o fracción con glicerol, se agrega cuando el semen llega a 5 °C.

3.- la adición de glicerol se puede realizar de varias maneras:

A) agregando esta fracción de una vez.

B) separado en 3 o 4 etapas cada 15-20 minutos.

C) agregándola por goteo lentamente (Cavestany 1994).

#### **D) Equilibración:**

El intervalo entre la adición de la fracción de diluyente con glicerol y el congelado se denomina equilibración (Cavestany, 1994).

El semen es usualmente diluido de 30° a 37° C con un medio equilibrador que contiene todos los ingredientes básicos del diluyente de congelación. La tasa de dilución es aproximadamente de 1:5 (semen/diluyente). Este procedimiento es necesario para proporcionar un medio tampón para los espermatozoides.

Una vez diluido el esperma es necesario permitir que éste se estabilice, de modo que los espermatozoides estén bien protegidos durante el proceso de congelación y descongelación.

Durante el equilibrado se produce un descenso de la temperatura del esperma desde los +20-30 °C hasta los +5 °C, el cual debe realizarse a velocidad uniforme y durante un periodo de 1,5 a 2 horas (Maxwell y col., 1995).

Algunos trabajos en toros no observan efectos significativos del tiempo de equilibrado, en relación a la motilidad pos descongelado y la tasa de fertilidad, mientras que otros recomiendan, por lo menos, de 4-6 horas en el tiempo de equilibrado. Resultados obtenidos por Dhamy y Shan (1993), demuestran que por lo menos 2 horas de equilibrado a 5 °C son esenciales para la congelación de semen bovino, obteniendo buenos resultados de fertilidad. Kumar y col. (1981), investigando el tiempo de equilibrado en relación a la motilidad pos descongelado, encontraron mejores resultados cuando el semen era sometido a un periodo de 4 horas a 5 °C.

Existen diferentes protocolos del tiempo de equilibrado, aunque es de notar que el tiempo más usado es de 4 horas. Así Chistensen y col. (1999) utilizan un tiempo de equilibrado de 4 horas a 5° C; Gil y col. (2000); Amirat y col. (2004); Muino y col. (2009); Koivisto y col. (2009): equilibran 4 horas a 4° C. Muino y col. (2007): ha llegado a equilibrar hasta 18 horas 4° C; en cambio Mousa y col. (2002): 1,5 horas a 4° C.

Ticiano y col. (2010) concluyen que el equilibrado durante el proceso de congelación es esencial para el mantenimiento de la motilidad y la integridad de la membrana plasmática, encontrando que el tiempo de equilibrado de 4 horas muestra la mayor viabilidad espermática, independientemente del tipo de diluyente.

#### **En resumen:**

1.- El intervalo entre la adición de la fracción de diluyente con glicerol y el congelado se denomina equilibración. Primero se pensó que este intervalo era necesario para permitir al espermatozoide ajustarse al glicerol, a la vez permitir que éste penetrara en la célula. En la actualidad se puede comprobar que el glicerol penetra rápidamente la

célula, y que este intervalo era necesario para que el espermatozoide se ajuste a la temperatura fría.

2.- En la práctica, el período de equilibración es generalmente de 4-18 horas, y la duración del mismo está determinada por razones prácticas principalmente. Normalmente, con un período de enfriado de 4 horas, 1-2 horas de equilibración suelen ser suficientes para asegurarse una buena fertilidad.

3.- Durante la equilibración, el semen es envasado en las pajuelas previamente identificadas.

Estas se marcan en las pajuelas mecanográficamente, mediante un instrumento apropiado, y se secan con aire caliente. El color de la tinta varía según las normas establecidas. Las pajuelas se identifican bien mediante la escritura de los datos necesarios, valiéndose de los estampados apropiado: C.E.R. manual o semiautomática para las pajuelas normales; o bien la Marken (CA 001) para las medianas de 0.5 ml, y pequeñas de 0.25 mL (Cavestany, 1994).

### **E) Envasado:**

Los actuales métodos de envasado de semen de toros se basan principalmente en las mini pajuelas francesas de 0,25 ml. (Christensen y *col.*, 1999; Gil y *col.*, 2000; Thum y *col.*, 2002; Muino y *col.*, 2007; Muino y *col.*, 2009; Contri, y *col.*, 2010). El procedimiento ha estado en funcionamiento durante muchos años, y en general ha funcionado bien para el semen envasado y congelado. Aunque no podemos obviar que también se usan las mini pajuelas de 0,50 ml. (Koivisto y *col.*, 2009; Ticiano y *col.*, 2010).

Estudios realizados por Clulow y *col.* (2008), indican que en la congelación en pajuelas de 0,25 y 0,50 ml, no se observan diferencias significativas en los parámetros evaluados después de la criopreservación del semen. Para la congelación de espermatozoides de carnero usando pajuelas de 0,5 ml, han sido reportadas mejoras de la motilidad pos descongelado, en comparación con pajuelas de 0,25 ml (Maxwell y *col.*, 1995). Estos autores plantearon la hipótesis de que la diferencia en el área de superficie, con la tasa de volumen entre los dos tamaños de pajueta, resulta en una tasa de congelación lenta para las pajuelas de 0,50 ml, lo que resultó beneficioso para los espermatozoides de carnero.

Cochran y *col.* (1984) observan que los espermatozoides de caballo toleran una amplia gama de porcentaje de congelación, lo que sugiere que las pequeñas diferencias entre las tasa de congelación entre pajuelas de 0,25 y 0,50 ml, puede no contribuir a las diferencias de la viabilidad pos-descongelado.

Las pajuelas tienen un tapón de algodón en un extremo y alcohol polivinílico o ultrasonido en la otra punta.

Luego del llenado, el otro extremo se sella con ultrasonido (si se usa la envasadora automática), o sumergiendo el extremo de la pajueta en alcohol polivinílico (esta droga viene en polvo, y al contacto con el líquido se humedece, sellando la pajueta). Para el llenado de las pajuelas se montan sobre soportes especiales. El llenado se realiza por aspiración, mediante los adecuados “peines” portadores, conectadas a una bomba

aspirante, con un ritmo de 5.000 mini pajuelas por hora. Cuando se sumerge a las pajuelas en el material seminal para aspirar se hace entrar una burbuja de aire para evitar que el tapón resbale durante las sucesivas operaciones de congelado y descongelado. Los extremos de las pajuelas sumergidas en el semen se secan con papel de filtro estéril después de su cierre, lo cual se hace sumergiendo dichos extremos en polvo de alcohol polivinílico (Bonadonna, 1989). Este tipo de método fue desarrollado por el Dr. Robert Cassou, el cual es actualmente uno de los métodos más difundidos en el mundo (Cavestany, 1994).

## **F) Congelación:**

El proceso de congelación expone a las células espermáticas a una pérdida de agua y a un incremento de la concentración de solutos intra y extracelulares. La búsqueda de una velocidad óptima de congelación, para prevenir la formación de cristales intracelulares y minimizar el tiempo de exposición a la concentración de solutos, es un hecho de mucha relevancia, ya que de ello depende el éxito de un proceso de congelación. La disminución de la temperatura debe realizarse de forma más o menos lenta, con el fin de mantener las características de las proteínas del plasma seminal que interaccionaran con las del núcleo espermático (Mazur, 1984).

Un gran número de protocolos de congelación han sido desarrollados, debido principalmente a las diferencias observadas entre especies, sin que se haya determinado con exactitud una curva estándar. Esto se debe principalmente a que los resultados dependen de factores tales como diluyentes, crioprotectores, calidad seminal (parámetro altamente variable entre individuos), etc. (Woelders y *col.*, 2003).

Aunque se han realizados considerables investigaciones para determinar la tasa óptima de congelación y la adaptación de las curvas de enfriamiento individuales para cada toro, ha habido muy poco progreso en el sentido práctico (Vishwanath y Shannon, 2000).

El semen de toros puede ser conservado sobre congeladores de vapores estáticos, vapores de nitrógeno líquido, o mediante el uso de congeladores programables. La mayor parte de los trabajos publicados utilizan congeladores programables a un ritmo de congelación de 5° C/min entre los +5° C a -10° C; de -40° C/min entre los -10 °C a -100 °C; de -20 °C/min entre los -100 °C a -140 °C. (Muino y *col.*, 2007; Muino y *col.*, 2009; Contri y *col.*, 2010). Además, otras pautas de congelación son, de 5 °C/min entre los +5 °C a -10 °C, y -40° C/min entre los -10 °C a -150 °C. (Kommisrud y *col.*, 1996; Gil y *col.*, 2000; Mousa y *col.*, 2002). Christensen y *col.* (1999) proponen un ritmo de congelación más agresivo, de -60° C/min entre +5° C y -120° C, transfiriendo luego a nitrógeno líquido.

En relación a la congelación en vapores estáticos de nitrógeno, algunos centros aun lo siguen utilizando, aunque este sistema presenta grandes desventajas, ya que las muestras seminales están sometidas a condiciones incontrolables de congelación.

Cuando la congelación se realiza sobre vapores de nitrógeno líquido, el ritmo de congelación varía según la altura a la que se colocan las pajuelas. En este tipo de congelación, la tasa de descenso de la temperatura oscila entre los 150° C/min y 300°

C/min. Thum y *col.* (2002) utilizan bajo este sistema, un ritmo de congelación de - 150° C en 7 minutos, con buenos parámetros seminales pos-descongelado.

La ventaja de congelar en vapores estáticos es que todas las pajuelas en cualquier ciclo dado de congelación, están sujetas a las mismas tasas de enfriamiento, porque las pajuelas están colocadas a un solo nivel del nitrógeno líquido. En cambio, en los congeladores programables las pajuelas están colocadas en más de un nivel, y ello contribuye a considerables variaciones en la tasa de congelación (Vishwanath y Shannon, 2000).

El uso de vapores de nitrógeno líquido se hace mayormente en cajas de espumaplast. Este sistema es muy parecido al anterior. Las pajuelas son colocadas comúnmente a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno, por un periodo de exposición de 10 minutos (Amirat y *col.*, 2004). El ritmo de congelación depende exclusivamente de la distancia que existe entre las pajuelas y el nivel de nitrógeno, siendo por lo general de 60° C/min. Trabajos llevados a cabo por diferentes autores, como Cochran y *col.* (1984), no han encontrado diferencias significativas en la motilidad pos-descongelado del semen a distancias variables sobre la superficie del nitrógeno líquido.

Para Vázquez y *col.* (1998), la congelación en vapores de nitrógeno líquido debe realizarse durante al menos 10 minutos.

En cuanto a las propiedades del nitrógeno líquido, éste, es un gas neutro, incoloro, inodoro e insípido; seco e inerte, insoluble en agua y solventes habituales. No genera cargas eléctricas importantes, puede ser almacenado a altas presiones o en forma líquida (-196° C). No es combustible y al evaporarse forma una columna blanca que se debe a la condensación de la humedad ambiente. Por cada litro de nitrógeno líquido evaporado, se producen 680 litros de nitrógeno gaseoso. Esto es muy importante y se debe tener en cuenta ya que en ambientes cerrados desplaza al oxígeno, y puede producir mareos, somnolencia y hasta cuadros de asfixias. (CIAVT, 1987).

### **G) Descongelado:**

Existen interrelaciones entre las tasas de congelado y descongelado y los diluyentes, así como factores como concentración de glicerol, tamaño y forma del envase del semen, composición del contenido, medio de descongelado (ej., agua, aire, etc.), temperatura y método de descongelación (Cavestany, 1994).

Generalmente, considerando que mueren entre un 20-50% de los espermatozoides en el proceso de congelación y descongelación, y que un eyaculado promedio contiene entre un 70-90% de espermatozoides vivos, se puede estimar que un semen con buena motilidad progresiva de alrededor del 40%, luego del descongelado, puede ser considerado apto para la inseminación (Cavestany, 1994).

Dentro de los métodos de descongelado están los siguientes (sin que el orden en que se enumeren signifique necesariamente una jerarquización de los mismos):

#### ***Descongelado al aire a temperatura ambiente.***

Este método consiste en sacar la pajuela del termo y mantenerla en el bolsillo hasta la inseminación.

***Descongelado en agua a 40° C por 1 minuto.***

La pajuela se coloca en baño María a esa temperatura, y luego se traspasa a la pistola de inseminación.

***Descongelado a 75° C por 12 segundos.***

***Descongelado en agua a 37° C por 35 segundos.***

**Semen Sexado, Técnica y Consideraciones Varias**

En los 80 ó más años precedentes, los científicos han intentado preseleccionar, con seguridad, el sexo de la progenie animal. Sin embargo ningún método ha sido tan exitoso como el desarrollado por el Dr. Lawrence Johnson: Citometría. Método éste que fue patentado por el departamento de agricultura de los EE.UU en el año 1992.

El espermatozoide es el que siempre determinará el sexo de una cría. El caso es que el espermatozoide puede contener o un cromosoma "X" o uno "Y"; por su parte el óvulo siempre poseerá un cromosoma "X". Por tanto, para que se produzca una becerra (XX) deberá un espermatozoide "X" fertilizar el óvulo. Por el contrario, si fuera el espermatozoide con cromosoma "Y" el que lo fertilizara, se produciría un macho (XY). En los vacunos, el espermatozoide "X" tiene 3.8% más ADN (ácido desoxiribonucleico) que el espermatozoide "Y". Por otro lado, la mitad de los espermatozoides producidos portan el cromosoma "X"; la otra mitad el "Y" (Johnson, 1987).

Citometría de Flujo

La citometría, desarrollada por el Dr. Johnson que, consigna un 90% de seguridad en el sexaje del semen, toma base en esas diferencias de ADN expuestas para hacer dicho sexaje. Para arrancar en el proceso en cuestión (citometría), el semen tiene que ser teñido con un colorante fluorescente, el cual se unirá a cada espermatozoide individual según su contenido de ADN. Se hacen pasar luego los espermatozoides a la manera de una corriente o flujo muy delgado a través de la máquina separadora, misma que utiliza un rayo láser, que lo que esencialmente hace es iluminar el colorante. Como el espermatozoide " X " contiene 3.8 % más de ADN, éste atrapa más colorante, y hace que resplandezca más brillantemente.

Posteriormente una computadora clasifica los espermatozoides en tres grupos: 1) los que llevan cromosoma "X", 2) los que portan "Y", 3) una población mixta de portadores de "X" y de "Y "(que no pudieron ser clasificados con absoluta claridad). Aquel flujo fino de espermatozoides se fracciona entonces en gotitas pequeñísimas conteniendo un espermatozoide cada una de ellas, pasando las mismas por un dispositivo que les asigna una carga eléctrica positiva o negativa, según la clasificación previa efectuada por la computadora. Se les hace pasar luego por un campo magnético donde aquellas con carga positiva son atraídas hacia el lado negativo, y las que poseen carga negativa lo son hacia el lado positivo. Una vez que los espermatozoides han sido apartados en tal forma, el semen fresco deberá usarse dentro de las siguientes 24 horas. Es posible también su congelación para ser utilizado con posterioridad (Johnson, 1999).

Ventajas del Sexaje de Semen

- Pueden programarse los reemplazos lecheros (o de aptitud cárnica) con base a inseminar las mejores vacas--de la media hacia arriba, preferentemente con semen sexado; supone esto un avance genético en las becerras que nazcan.
- Una porción de vacas lecheras, las no escogidas para la producción de reemplazos lecheros, pudieran dedicarse a otros objetivos, producción de carne cruzándose con toros de razas para carne. Convertirse en receptoras de embriones, etc.
- El porcentaje de desecho voluntario de las vacas subproductivas (presión de selección) podría acentuarse, dada la mayor disponibilidad de vaquillonas para la reposición.
- Las vaquillas sobrantes, tras el reemplazo habitual del hato, podrían convertirse en "receptoras" de embriones de calidad genética superior.
- Los toros jóvenes podrían ser probados más eficientemente por la preponderancia del número de hijas en sus progenies (DeJarnette, 2007).
- Puede disminuirse la incidencia de partos distócicos.
- Es factible que en vacas de alta producción lechera, en las que exista una problemática para preñarse, se les deje sin preñar, y se le explote con lactancias más largas. Puede sopesarse la rentabilidad de este criterio al considerar que un parto es "un factor de riesgo", por si mismo, amén de enfocar todos los posibles derivados metabólicos nocivos resultantes del mismo parto: fiebre de leche, cetosis, desplazamiento de abomaso, etc.
- El costo de reposición, hasta hoy en día de alta incidencia en la rentabilidad de las empresas lecheras, se vería reducido habida cuenta de la mayor oferta de vaquillas en el mercado. Como es obvio, ello mejoraría la productividad de las empresas.
- La venta de vaquillas excedentes tras la reposición del hato, mejoraría los ingresos de la empresa, al cotejarlos con los obtenidos por la venta de los becerros machos o toretes (Fetrow, 2007).

### Limitantes

El Dr. George Seidel, investigador connotado en el campo del sexaje de semen manifiesta que:

- "Desde el punto de vista de eficiencia es una tecnología terrible"
- "Hay un 20 por ciento menos en las tasas de preñez"
- "La separación de espermatozoides (de un sexo determinado) con un 90% de seguridad es lenta, porque cada espermatozoide debe ser contado individualmente".
- "El solo hecho de contar (segregar) cada espermatozoide supone estrés y daño para él en el proceso".

Otras posibles limitantes que merecen análisis para la adopción del sexaje del semen podrían ser:

- Tendría que pensarse en una mayor administración para la crianza de un lote más grande de hembras (casi el doble).
- Un aumento de inversiones y mano de obra para criar más vaquillonas.
- El incremento en el número de reemplazos en la granja implicaría una disminución de recursos forrajeros destinados a la producción de leche.
- Tal vez una presión de selección intensa conllevaría a una baja en la variabilidad genética de la población.
- Quizá al disminuir la variabilidad genética podría incurrirse en el incremento de la consanguinidad.
- Quienes tendrían que ser inseminadas primeramente, en orden de prioridad, para asegurar una mayor eficiencia reproductiva, serían las vaquillas. Y de éstas aún no se reconoce su genotipo ante el ambiente.
- Costo elevado del equipamiento para realizar la técnica; 250.000-300.000 USU.
- El precio a pagar por una pajilla de semen sexado, seguramente que tendría que ser mucho más elevado que el que se paga actualmente por el semen comercial de una alta calidad genética.

### **III) Evaluación del Semen post Congelado**

#### Evaluación Morfológica Post Descongelado

La morfología espermática indica desviaciones de la espermatogénesis y la maduración epididimaria y sus resultados, convenientemente evaluados, son usados para eliminar reproductores con semen de baja calidad para IA, en casos en los que éstos indiquen patologías genitales mayores. La morfología de la muestra seminal per se no nos provee de información suficiente para juzgar el nivel esperado de fertilidad del semen luego de la IA, independientemente si ésta es juzgada subjetivamente o usando un equipo computarizado (ASMA), ya que en muchos casos un número total de espermatozoides alto en la dosis, es capaz de compensar, por un porcentaje alto de anomalías morfológicas. Recientemente, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales ha sido identificado como un parámetro relacionado estadísticamente ( $r= 0.54$ ) con fertilidad (tasas de concepción corregidas) (Rodríguez-Martínez, 2001) (Muiño y col. 2005).

#### Motilidad Espermática

La motilidad espermática es el parámetro más frecuentemente utilizado para medir la viabilidad del semen eyaculado y durante el proceso de preservación, como ha sido

descrito anteriormente. Como se ha indicado anteriormente, los equipos computarizados CASA se vienen usando más asiduamente, aun cuando los mismos todavía adolecen de desvíos causados por la programación o por el operador, no siempre mostrando relación entre la motilidad del semen preservado y la fertilidad. Los análisis de muestras seminales estandarizadas de toro han mostrado, sin embargo, que ciertos patrones de motilidad, como la linealidad, correlacionan significativamente con la fertilidad a campo ( $r^2 = 0.45-0.63$ ). Existe una correlación positiva significativa entre la motilidad y velocidad espermática post-congelación con la tasa de no retorno (Rodríguez-Martínez, 2001) (Muiño y col. 2005).

### Análisis de la Viabilidad Espermática

El estudio de la viabilidad espermática normalmente se base en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos es capaz de atravesar la membrana plasmática dañada o degenerada y por tanto permite identificar las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables (Garner, 1997).

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el yoduro de propicio (PI). Este compuesto entra en espermatozoides con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y, al ser excitado por la longitud de onda apropiada (510-560 nm), emite fluorescencia roja. Además del PI, existen otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas cuyo mecanismo de acción es similar, como por ejemplo el Hoechst 33258 (Keeler, 1983) o la hidroetidina (HED) (Ericsson, 1989), entre otros.

Entre los fluorocromos más utilizados para identificar la población de células vivas se encuentra el grupo de las carboxifluoresceinas: CFFDA: diacetato de carboxifluoresceína (Harrison y Vickers, 1990), CMFDA: diacetato de carboximetilfluoresceína, (Garner, 1986) o CDMFDA: diacetato de carboxidimetilfluoresceína (Ericsson, 1990), que son compuestos no fluorescentes capaces de atravesar membranas celulares intactas. En el interior de las células, debido a la acción de esterasas intracelulares, se convierten en carboxifluoresceína, molécula que al ser excitada a una longitud de onda de 488 nm emite fluorescencia verde, quedando retenida intracelularmente por membranas celulares intactas.

Otro fluorocromo ampliamente utilizado para identificar espermatozoides vivos es el SYBR-14, que es capaz de atravesar membranas intactas y de unirse al ADN de los espermatozoides (Garner, y Johnson, 1995). Es una molécula más estable que otros compuestos con tal fin, no tiene que sufrir transformación enzimática para poder actuar, y se une específicamente al ADN del espermatozoide, lo que supone que toda partícula que no contenga dicho material genético no se va a marcar, y por tanto quedará descartada del análisis. El SYBR-14 suele utilizarse en combinaciones con PI, y de esta forma se pueden distinguir dos poblaciones espermáticas: una de ellas constituida por células muertas o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al PI, y por tanto emiten fluorescencia roja; y la otra constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al PI pero dejan entrar al SYBR-14, y por tanto emiten fluorescencia verde. Otro fluorocromo similar al SYBR-14 capaz de detectar espermatozoides vivos, es el Hoechst 33342. Este

compuesto también entra en células vivas y se une al ADN espermático, para evaluar las muestras con Hoechst 33342, es preciso disponer de un láser de menor longitud de onda (Muiño y col. 2005).

Decuadro (2002) y Christensen (2004) hablan de una correlación elevada entre la viabilidad espermática y capacidad fecundante de las dosis, siempre que se respete una concentración espermática mínima por pajuela.

### Capacidad Metabólica

La mensura del contenido de ATP mediante luminometría puede ser usado para determinar, indirectamente, el número de espermatozoides viables en una muestra. Ni el contenido de ATP ni la cuantificación de número de espermatozoides viables, determinada indirectamente por la medición de ATP, parecen estar correlacionados con fertilidad. Los mayores daños se producen en la membrana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación, donde se altera la función metabólica del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables y ocasionando una capacitación espermática prematura (Rodríguez-Martínez, 2001).

### Integridad del Acrosoma

La integridad del acrosoma post-descongelado puede también ser determinada morfológicamente, usualmente a niveles de microscopía óptica, tanto en muestras no teñidas como en muestras teñidas con diferentes tinciones empíricas (siendo Giemsa el más comúnmente utilizado), para indicar el grado de daño espermático causado por la criopreservación (Muiño y col. 2005). El estado de los acrosomas ha sido retrospectivamente correlacionado (estadísticamente significativo) con la fertilidad del semen congelado. Los fluoróforos y las lectinas marcadas también han sido aplicados a este nivel mostrando, en el bovino, correlaciones con fertilidad. La integridad del acrosoma del semen de toro post-descongelado también puede evaluarse indirectamente, midiendo la presencia de enzimas intraacrosomales en el medio seminal (tales como las amidasas, la acrosina, o las lactodeshidrogenasas) (Rodríguez-Martínez, 2001).

### Integridad de la Cromatina

Evaluación del grado de denaturalización del ADN usando citometría de flujo (el llamado método de SCSA) parece ser un complemento invaluable para evaluar microscópicamente morfología espermática en especies domésticas. Cuando se somete el semen a condiciones ácidas (denaturalización ácida), y se le incuba con colorantes metacromáticos como la naranja de acridina, el ADN de doble hélice muestra una fluorescencia verde, mientras que el ADN de hélice simple (dañado) da una fluorescencia roja. El método mide el grado de incremento de heterogeneidad estructural de la cromatina, la cual se asocia a disturbios en la espermatogénesis, visibles en anomalías espermáticas y por ende a la fertilidad seminal. Especialmente interesante es la aplicación del SCSA al semen de toros en esquemas de producción seminal, ya que algunos de los parámetros testados durante la evaluación de la estabilidad del ADN espermático a la denaturalización ácida (especialmente la proporción de células fuera de la población general [COMPAT]) tienen relación significativa ( $r= 0.94$ ) con la fertilidad de los reproductores, medida por inseminación

convencional o heterospérmica, seguida de la evaluación de paternidad mediante el uso de marcadores genéticos al nacimiento de los fetos.

### Análisis de la Funcionalidad Mitocondrial

El fluorocromo Rodamina 123 fue el primero que se utilizó para evaluar la funcionalidad mitocondrial en espermatozoides humanos, posteriormente en los de otras especies domésticas.

Este fluorocromo penetra en mitocondrias con actividad respiratoria y se acumula en su interior. Al incidir la luz del láser sobre espermatozoides teñidos con Rodamina 123, la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias activas emite una intensa fluorescencia verde (Ericsson, 1993). La Rodamina 123 suele utilizar en combinaciones con PI, se tiñe de rojo los espermatozoides degenerados y por tanto sin actividad mitocondrial. Aunque la Rodamina 123 permite cuantificar la población de espermatozoides con mitocondrias activas, no permite diferenciar el grado de actividad respiratoria de las células (Graham, 2001).

Evaluando dosis de semen congelado, Gillan (2005) observaron una elevada correlación entre el porcentaje de espermatozoides positivos a Rodamina 123 y el porcentaje de espermatozoides positivos a SYBR-14, lo que indica que los espermatozoides vivos en la mayor parte de los casos tienen funcionalidad mitocondrial.

Garner y Cheryl (1999) desarrollaron una nueva tinción mitocondrial utilizando el fluorocromo JC-1, que permite diferenciar entre espermatozoides con baja y alta capacidad respiratoria. El JC-1 se acumula en el interior de las mitocondrias, si la actividad respiratoria es baja, el JC-1 no llega a formar agregados y emite fluorescencia verde (Rodríguez-Martínez, 2001) (Muiño y col. 2005).

### Tests de Termoresistencia (Tests de Estrés Térmico o de Envejecimiento)

Estresar el semen congelado post-descongelación ha sido parte de los tests denominados de termoresistencia y practicados en todas las especies domésticas. Su racionalidad radica en que aquellos espermatozoides que sobreviven bien la criopreservación y son viables, van a soportar el estrés que representa incubarles a 37-39° C por períodos de varias horas, antes de tomar alícuotas para evaluar una serie de parámetros (ej., motilidad, morfología, estado de la membrana plasmática, acrosoma, contenido de ATP, etc.). Tomado en conjunto, este tipo de procedimiento ha mostrado que la relación con fertilidad aumenta para aquellos parámetros que se han encontrado relacionados con la misma al post-descongelado. No obstante, no se ha encontrado relación con fertilidad para otros parámetros (Rodríguez-Martínez, 2001).

### Métodos Funcionales de Evaluación in Vitro

Como se ha descrito anteriormente, la fertilidad seminal parece estar más cercanamente relacionada con la integridad de membrana que con la motilidad estimada, especialmente cuando se analiza un alto número de espermatozoides (usando FACS o Fluorometría. Sin embargo, guardando estas excepciones, pocos parámetros individuales de viabilidad espermática (definidos como motilidad, integridad de membrana o acrosoma, con cromatina normal, etc.), muestran una relación significativa con la fertilidad de la

muestra de semen descongelada, especialmente si los porcentajes de viabilidad se encuentran dentro de límites de normalidad aceptables. Por esta razón, y teniendo en cuenta que el proceso de fertilización es multifactorial y que cuantos más sean los parámetros espermáticos a ser testados mayor nivel de seguridad tendrá el test usado, las muestras de semen han sido sometidas a tests funcionales in vitro, capaces de discernir la habilidad del semen descongelado para llevar a cabo procesos celulares específicos y complicados como la capacitación, la unión a la ZP, la reacción acrosomal, la fecundación in vitro (FIV) y la inducción del desarrollo embrionario in Vitro (Rodríguez-Martínez, 2001) (Muiño y col. 2005).

### Tests de “Swim-up”

La población espermática presente en una muestra de semen normal tiene un carácter heterogéneo ya que está compuesta de varias generaciones espermatogénicas que han pasado diferentes periodos en el epididímo. Esta heterogeneidad se refleja usualmente en diferencias de morfología y motilidad. La mayoría de los espermatozoides muestran una motilidad típicamente progresiva y linear. La linearidad ha sido relacionada con fertilidad en toros y cerdos, y por ello se han desarrollado tests basados en la habilidad innata del espermatozoide para atravesar fluidos de una cierta viscosidad, los llamados test de “swim-up”, cuyos resultados han sido relacionados con la predicción de fertilidad, asumiendo que imitan la condición de selección espermática por morfología y motilidad normales in vivo durante el transporte a lo largo del tracto genital femenino.

Ya que la población espermática que llega al sitio de fertilización in vivo (espermatozoides potencialmente fértiles) está prácticamente 100% viva, este tipo de “filtro” fisiológico es el que inspira el uso de los tests de “Swim-up”, aun cuando sólo se remite a la capacidad del espermatozoide de expresar un cierto patrón de motilidad y prescinde de las relaciones del mismo con el epitelio del tracto genital femenino y sus secreciones.

Usando un “swim-up” simple a través de una columna de medio de cultivo, la concentración de espermatozoides de toro con motilidad linear obtenida se relacionó significativamente ( $r= 0.43$  y  $r= 0.63$  para operación de congelado y toro, respectivamente) con fertilidad. Resultados obtenidos indican que el número de espermatozoides viables luego del “swim-up” refleja la capacidad de fecundación innata de una muestra seminal. No obstante, es importante recordar que si bien tanto el número como la velocidad de los espermatozoides que pasan la columna de fluido pertenecen a las muestras más fértiles in vivo, es importante combinar este número de espermatozoides con la linearidad de la muestra seminal, ya que aproximadamente un 90% de los espermatozoides que pasan la columna muestran este patrón de motilidad (Rodríguez-Martínez, 2001).

### Tests de Unión Espermática a Explantos del Tracto Genital Femenino

Estudios in vitro han llevado al concepto que la unión de los espermatozoides con las células epiteliales del oviducto prolonga la vida de los mismos, presumiblemente porque una preferentemente los espermatozoides no capacitados. Por ello, el cocultivo de espermatozoides con explantos epiteliales de oviducto están siendo utilizados en condiciones controladas, para evaluar la fertilidad de los espermatozoides, en relación con su grado de unión al epitelio tubario. Esta unión se considera mantiene la viabilidad y capacita los espermatozoides, así como sería capaz de determinar la capacidad de una

muestra seminal para colonizar el reservorio oviductal. Espermatozoides de toro seleccionados por su habilidad para unirse al epitelio tubario en cultivo fueron capaces de aumentar la producción de embriones in vitro. El significado biológico de esta metodología es alto ya que si los espermatozoides capacitados por procesos de preservación no se unen al reservorio tubario in vivo, existiría una explicación para su baja fertilidad. Por ello, usar éste método in vitro, es lógico (Rodríguez-Martínez, 2001) (Muiño y col. 2005).

### Evaluación de la Estabilidad de la Membrana Plasmática (Capacitación)

Cambios similares a los vistos durante la capacitación espermática (y la reacción acrosómica) pueden ser visualizados indirectamente luego de la incubación de espermatozoides viables con el antibiótico fluorescente clorotetraciclina (CTC [106]), que emite fluorescencia mientras monitorea el desplazamiento de  $Ca^{++}$  en la parte interior de la membrana de la cabeza espermática, lo que ocurre durante la capacitación y la reacción acrosómica. La CTC atraviesa la membrana plasmática e ingresa en los compartimentos intracelulares que contienen  $Ca^{++}$  libre. Luego de ingresar a estos compartimentos, la CTC se carga negativamente y de esta manera une a sí  $Ca^{++}$  libre, aumentando su fluorescencia innata. Este complejo CTC-calcio se une preferentemente a la región hidrófoba del plasmalema, resultando así en patrones de tinción característico de las varias fases transicionales que los espermatozoides exhiben durante la capacitación y la reacción acrosómica. De esta manera, el método muestra – indirectamente- el estado de fluidez de la membrana plasmática en los dominios de la cabeza del espermatozoide.

Los análisis de espermatozoides descongelados de toro mediante CTC han mostrado que el proceso de criopreservación induce cambios similares a los que aparecen durante el dinámico proceso de capacitación. En toros de IA con fertilidad conocida, hasta un 30-40% de los espermatozoides procesados rutinariamente muestran cambios similares a la capacitación. Los espermatozoides congelados de toro penetran los ovocitos más rápidamente que los espermatozoides no congelados). Aún más, el porcentaje de espermatozoides no capacitados (no reactivos) en muestras de semen para IA fue un parámetro correlacionado en forma significativa con la fertilidad del semen post-IA, indicando que el método puede ser usado con fines pronósticos ( $r= 0.48$ ) de fertilidad. Esto no deja de tener un valor biológico importante, ya que la capacitación es un proceso continuo de desestabilización de la membrana plasmática que conduce a la muerte, explicando por qué el semen congelado tiene una sobrevivencia menor que el semen fresco luego de la inseminación, así como permitiendo identificar qué células mantienen un estado pre-capacitado, las que presumiblemente son las fecundantes (Rodríguez-Martínez, 2001).

### Reacción Acrosómica

La reacción acrosómica (RA) puede ser inducida in vitro por la exposición a ZPs homólogas, ZPs solubilizadas, o proteínas específicas aisladas de la ZP. Interesante es el hallazgo de que no todos los espermatozoides (verraco) responden con RA inmediata a la exposición a las proteínas de ZP, indicando la presencia de al menos dos subpoblaciones.

Los autores consideraron que la subpoblación de respuesta más lenta bien podría ser la fertilizante in vivo, lo que podría confirmar la relación hallada entre el porcentaje de espermatozoides no capacitados y fertilidad o de una relación presente entre el número de camada luego de IA en relación con una proporción baja de RAs. La RA también puede ser inducida in vitro por glucosaminoglicanos (GAGs) tales como la heparina. El grado de RA luego de la exposición de semen descongelado de toro a heparina fue significativamente correlacionado con la fertilidad. Las RA pueden ser también inducidas mediante un tratamiento con ionóforos de calcio (como el Hoechst A23187, por ejemplo), que promueve la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  al espermatozoide, pasando por encima de los mecanismos regulatorios celulares. Correlaciones significativas ( $r=0.60$ ) han sido descritas entre el grado de inducibilidad de la RA con la fertilidad de las muestras: como tasas de no retorno post-IA en toros,  $r=0.60$ , incluso a niveles predictivos (Rodríguez-Martínez, 2001).

### Tests de Unión del Espermatozoide a la Zona Pelúcida

La unión efectiva del espermatozoide a la ZP es una etapa temprana y crítica del proceso de fecundación del ovocito, la cual aumenta luego de la capacitación y se relaciona con la RA causada por la ZP. El conocimiento de esta cascada de eventos, imprescindible para que ocurra la fecundación, ha llevado al diseño de tests de unión espermatozoide-ZP in vitro (ZBA), intentando poder predecir la capacidad fecundante potencial de la muestra seminal, a pesar de que las poblaciones testadas no necesariamente están capacitadas (lo que disminuye el valor biológico del test) al menos en el cerdo. Dos tipos de tests de unión espermatozoide-ZP han sido probados para el espermatozoide bovino, uno incubando espermatozoides descongelados no-capacitados con ovocitos homólogos intactos (no divididos) [ZBA], y el otro usando hemizonas vacías (de ovocitos divididos por microbisección), el llamado test de hemizona (HZA), donde cada mitad de la ZP es incubada con espermatozoides de una muestra testigo y una muestra a evaluar, respectivamente.

Correlaciones significativas han sido obtenidas con la fertilidad post-IA, usando ambos tipos de tests de unión espermatozoide-ZP. El método primeramente descrito (ZBA) es, sin embargo, mucho más sencillo y menos tedioso que el HZA, siempre y cuando un número importante de ovocitos se incluyen en cada test, para disminuir la variación inter ovocitaria. Con éste método, se obtuvo una correlación del 0.50 ( $P=0.02$ ) entre el número (promedio) de espermatozoides unidos a la ZP y la fertilidad (tasa [%] de no retorno al celo 56 días después de IA) de 22 toros testados en IA. Otras técnicas han sido desarrolladas recientemente usando preparaciones de membrana peri-vitelina del huevo de pollo, solubilizadas mediante el calor. La unión in vitro de espermatozoides móviles de pollo, toro, humano, roedores, cerdos y caballos a estas preparaciones parece ser inespecífica, pero muestra un carácter de dosis-respuesta, mide el grado de viabilidad espermática y, para aves, es capaz de detectar sub-fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2001) (Muiño y col. 2005).

### Recuento de Espermatozoides Accesorios

Los espermatozoides accesorios son aquellos atrapados en la ZP de ovocitos o de embriones tempranos. Ya que los mismos se encuentran generalmente en el tercio o dos tercios exteriores de la ZP, los mismos han demostrado tener los atributos espermáticos para penetrar la misma y por ello se les debe considerar haber sido potencialmente

fértiles, *in vivo* o *in Vitro*. En el bovino, la tasa de fertilización y el número de espermatozoides accesorios se siguen estadísticamente *in vivo*, y por ende, se les atribuye una cierta capacidad de mensura de la capacidad fertilizante del semen. Estos datos abren la posibilidad de utilizar el recuento de espermatozoides accesorios como un test de la capacidad de los mismos para demostrar parte de sus atributos fertilizantes *in vitro*, tal como ha sido usado para determinar la capacidad fecundante de semen con defectos morfológicos específicos. Desgraciadamente, la relación espermatozoides: ovocito es todavía no fisiológica y enmascara las posibilidades de diagnóstico ya que el número de espermatozoides usado es excesivo (Rodríguez-Martínez, 2001).

### Penetración *in Vitro*

La fertilidad *in vitro* también puede ser evaluada usando los llamados tests de penetración ovocitaria en los cuales la presencia de espermatozoides o de pronúcleos visibles en el ovoplasma son determinantes del éxito del test. Relación entre los tests de penetración *in vitro* y la fertilidad de los reproductores fueron reportados en toros, éste último testando espermatozoides de varios toros simultáneamente, los cuales habían sido específicamente marcados con tinciones fluorescentes, de modo de poder medir su penetrabilidad relativa (Rodríguez-Martínez, 2001) (Muiño y col. 2005).

### Fecundación *in Vitro* (FIV)

Siendo la FIV el método *in vitro* que más de cerca imita las condiciones durante la fecundación *in vivo*, innumerables estudios han tratado de usar FIV como test de fertilidad de muestras seminales, especialmente en el bovino, cerdo y ovino. El uso de espermatozoides de un reproductor determinado afecta los resultados de FIV. Aunque una relación estadísticamente significativa entre la fertilidad *in vitro* e *in vivo* no ha estado siempre presente, la mayoría de los estudios reportados ha demostrado, en forma retrospectiva, la existencia de esa relación para toro.

Estudios retrospectivos del semen criopreservado de toros con un rango amplio de fertilidad post-IA han demostrado una correlación positiva y estadísticamente significativa ( $r= 0.59$ ,  $P < 0.001$ ) entre tasas de clivaje cigótico *in vitro* (que refleja la capacidad mitótica del cigoto), y las tasas de no retorno al estro 56 días después de la IA en una población de toros con tasas de fertilidad dispares.

Evaluando los resultados a nivel de la producción de blastocistos *in vitro* (7-9 días de cultivo), la correlación con la fertilidad *in vivo* existió, pero los coeficientes de correlación fueron menores ( $r= 0.35$ ,  $P < 0.05$ ), probablemente debido a que el desarrollo del embrión temprano depende más de las condiciones de cultivo que de la fuente de los espermatozoides, para alcanzar el estadio de blastocisto. Para ambos parámetros medidos, los resultados demuestran sin embargo, una fuerte evidencia de la existencia de componentes seminales no-compensables en los toros de menor fertilidad.

Ha sido reportado un efecto-toro específico en los resultados de FIV como método utilizado en la predicción de la fertilidad, involucrando una significativa variación en la proporción de ovocitos fecundados *in vitro* y su relación con la fertilidad. Así, por ejemplo, ha sido reportado por Zhang y col. (1995) una correlación positiva significativa entre la tasa de división y la formación de blastocisto *in vitro* con la tasa de no retorno a los 56 días. En el mismo sentido, Bredbacka y col. (1997) encontraron una

relación positiva muy significativa ( $r= 0,82$ ) entre los índices de FIV y la tasa de no retorno a los 60 días (Rodríguez-Martínez, 2001) (Muiño y col. 2005).

## 7) BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, C.M., de Dominicis, O.H., Narbaitz M., de Apellániz, A., Cabodevila, J., Callejas, S., y Cisale, H. (2001) Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este Evaluación de toros en rodeos de cría: ¿Es necesario el examen del semen? Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar) fecha de consulta noviembre 2011.
2. Amann, RP., Hammerstedt, RH. (2002) Detection of differences in fertility. *J. Androl.*, 23 (3), 317-325.
3. Amann, R. P., Pickett, B. W. (1987) Principles of Cryopreservation and a Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
4. Amirat L., Tainturied D., Jeanneau L, Thorin C ., Gerard O., Courtens J.L., Anton M. (2004) Bull Semen in Vitro Fertility After Cryopreservation Using Egg Yolk LDL: a Comparison With Optidyl, a Commercial Egg Yolk Extender. *Theriogenology* 61: 895–907.
5. Andrade M., Celeste A. (2005) Influencia en la Calidad Espermática de la Adición de Distintas Concentraciones de Crioprotectores para la Conservación del Semen Canino. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral.
6. Arthur, GH., Noakes, DE., Pearson, H. (1991) Reproducción y Obstetricia en Veterinaria (Teriogenologia). McGraw-Hill-Interamericana, Madrid. 702 p.
7. Ball, BA., Medina, V., Gr avance, CG., Baumber, J. (2001b) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5° C. *Theriogenology* 56:577-589.
8. Barth, AD., Oko, RJ. (1989) Abnormal Morphology of bovine Spermatozoa. Iowa State University Press.
9. Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, JM., Magistrini, M. (2001) Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 68:181-190.
10. Baumber, J., Ball, BA., Linfor, JJ., Meyers, SA. (2002) Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology* 58:301-302.

11. Bloom, E. (1977) Sperm morphology with reference to bull infertility. First All-India Symp. Anim. Reprod., pp: 61-81.
12. Boixo, JC. (1996) Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad inform. Vet., pp:33-37.
13. Bonadonna, T. (1986) Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Buenos Aires, Tomo I. Hemisferio Sur., 286 p.
14. Bonadonna, T. (1989) Reproducción animal e I.A.; Tomo II, Buenos Aires. Hemisferio Sur. 1028p.
15. Carr, AC., McCall, MR., Frei, B. (2000a) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1716-1723.
16. Catena, M., Cabodevilla, V. (1999) Evaluación del semen bovino congelado. *Taurus*, (13), 13-31.
17. Cavestany, D. (1994) Procesamiento y Congelación de Semen de Toro, Montevideo, Santa Catalina, 23 p.
18. Centro de Inseminación Artificial de Venado Tuerto (CIAVT), (1987) Manual de Inseminación. Centro de Inseminación de Venado Tuerto, 3ª ed., Buenos Aires, 167p.
19. Cheema, RS., Bansal, AK., Bilaspuri, GS. Reactive oxygen species and cryopreservation. Ludhiana. Disponible en [www.http://proxy.timbo.org.uy](http://proxy.timbo.org.uy): Fecha de consulta: 21/12/2010.
20. Christensen., Brockoff P., and Lehn-Jensen H. (1999) The Relationship between Semen Quality and the Nonreturn Rate of Bulls. *Reprod Dom Anim* 23:503-507.
21. Clulow, J. R., Mansfiel, L. J., Morris, L. H. A., Evans, G., Maxwell, W. M. C. (2008) A Comparison Between Freezing Methods for the Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 108: 298–308.
22. Contri A., Valorz C., Faustini M., Wehger L., Carluccio A. (2010) Effect of Semen Preparation on Casa Motility Results in Cryopreserved Bull Spermatozoa. *Theriogenology* 74: 424-435.
23. Dahamy, A. J., Y Sahny, K. L. (1993) Evaluation of Different Cooling Rates, Equilibration Periods and Diluents for Effects on Deep-Freezing, Enzyme Leakage and Fertility of Taurine Bull Spermatozoa. *Theriogenology* 40:1269-1280.
24. Davis, RO., Drobnis, EZ., Overstreet, JW. (1995) Applications of multivariate cluster, discriminant function and stepwise regression analysis to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil. Steril.*, 63, 1051-1057.

25. Decuadro, H., Camus, A., Guy, D. (2002) Assessment of bull semen characteristics by flow cytometry and their relation with non return rates: a preliminary study in France. 14 th Meeting European A.I. VETS. Pp: 105-108.
26. DeJarnette, JM. Nebel, RL. Meek, B. (2007) et al. Commercial application of sex-sorted semen in Holstein heifers. *J Dairy Sci*; Vol. 90, Suppl. 1.
27. De La fuente, J. (1999) VI Congreso Internacional de Medicina Bovina. ANEBE. Pp.49.
28. Douard, V., Hermier, D., Blesbois, E. (2000) Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. *Biol. Reprod.* 63:1450-1456.
29. Elhordoy, D., Farias, D. (1998) Manual de inseminación artificial en bovinos. Pp. 95.
30. Ericsson, S.A., Garner, D.L., Thomas, C.A., Downing, T.W. and C.E. Marshall, (1993) Interrelationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of feozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 39: 1009-1024.
31. Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchorougui, T. J., Overstret, J. W., Crowe, J. H. (1993) Cold Shock Damage is Due to Lipid Phase Transictions in Cell Membranes: a Demonstration Using Sperm as a Model. *The Journal Exp Zool* 265: 432-437.
32. Fahy, G. M. 1986. The Relevance of Cryoprotectant 'Toxicity' to Cryobiology. *Cryobiology* 23, 1-13.
33. Fetrow, J. Overton, M. Eicker, S. (2007) Sexed semen: economics of a new technology. *Proceedings of the Western Dairy Management Conference*.
34. Foote, R. H. (1967) Influence of light and agitation on bovine spermatozoa stored with protective agent. *J. Dairy Sci.* 50:1468-1474.
35. Foote, R. H. (2002) The history of Artificial Insemination: Selected Notes and Notables. American Society of Animal Science.
36. Garner, DL, Cheryl, AT. (1999) Organelle- specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 222-229.
37. Garner, D.L., Johnson, LA. (1995) Viability assessment of the mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.*, 53: 276-284.
38. Garner, DL. (1997) Ancillary test bull semen quality. *Bull infertility. Veterinary clinics of north America: Food Animal Practice*, Vol. 13 (2), 313-330.
39. Graham, DG. (2001) Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 68, 239-247.

40. Gran, DG., Dott, HM. (1976) The ultrastructure of knobbed bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47 (42), 407-408.
41. Gil J., Januskaukas A., Haard M., Haard M., Johaisson A., Soderquist L., Rodriguez-Martinez H. (2000) Functional Sper Parameters and Fertility of Bull Semen Extended in Biociphos-Plus R and Triladyl R. *Reprod Dom Anim*; 35: 69-77.
42. Gillan, L., Evans, G., Maxwell, WMC. (2005) Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potencial. *Theriogenology*, 63 (2), 445-57.
43. Hafez, E. (1996) *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Buenos Aires. Interamericana. 6a. ed. 542 p.
44. Hafez, E. (2000) *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Buenos Aires. Interamericana. 7a. ed. 750 p
45. Hafs, HD., Boyd, L., Cameron, S., Dombroski, F. (1969) Fertility of bull semen with amylase and polymixin. *AI Digest*, 17:8-18.
46. Hammerstedet, R. H.; Graham, J. K.; Nolan, J. P. (1990) Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J Androl* 11: 73-88.
47. Harrison, R.A.P., Vickers S.E. (1990) Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88, 343-352.
48. Holt, W. (2000a) Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:3-22.
49. Holt, WV. (1996) Can we predict fertility rates?. Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 17-24.
50. Holt, WV, Van Look, JW. (2004) Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*, 127, 527-535.
51. Howe, GR. (1973) Efforts to relate spermatozoa motility to fertilizing capacity. *Int. J. Fert.*, 3:188-190.
52. Imai, H., Suzuki, K., Ishizaka, K., Ichinose, S., Oshima, H., Okayasu, I., Emoto, K., Umeda, M., Nakagawa, Y. (2001) Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.* 64:674-683.
53. Januskaukas, A., Söderquist, L., Håård, M.G., Håård, MCh., Lundeheim, N. and H. Rodríguez-Martínez, (1996) Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of Swedish Red and White A.I. bulls. *Acta vet. scand.*, 37: 461-470.
54. Januskaukas, A., Zilinskas, H. (2002) Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika*. 17 (39).

55. Jimenez, M. F., Puchadez, S., E. Moce, M. P., Viudes de Castro., J. S. Rodriguez V., Rodriguez V. (2004) Use of Powdered Egg Yolk vs Fresh Egg Yolk for the Cryopreservation of Ovine Semen. *Reprod Dom Anim* 39: 438-441.
56. Johnson, LA, Flook, JP, Look, MV. (1987) Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res.*, 17:203-212.
57. Johnson LA, Welch GR, Rens W. (1999) The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *J Anim Sci.*, 77 Suppl 2:213-220.
58. Kaemmerer, K., Kramoitz, G. (1955) Untersuchungen uber die Gelbfarbung des Spermas. *Dtsch. Tierarz. Wschr.* 62:19-20. Keeler, KD., Mackenzie, NM., Dresser, DW. (1983) Flow Microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. *J. Reprod. Fert.*, 68, 205-212.
59. Koivisto, M. B., Costa, M .T. A., Perri, S. H. V., Vicente, W. R. R. (2009) The Effect of Season on Semen Characteristics and Freezability in Bos Indicus and Bos taurus Bulls in the Southeastern Region of Brazil. *Reprod Dom Anim* 44: 587–592.
60. Kommisrud E., Graffer T., Steine T. (1996) Comparison of Two Processing Systems for Bull Semen with to Pos-Thaw Motility and Non return Rates. *Theriogenology* 45: 1515-1521.
61. Lagerlof, N. (1934) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, suppl. 19, 254 p.
62. Llambi, A., Kumar T., Rakesh, Y., Singh, Y., and Mathooro, J. S. (1981) Effect of Different Equilibration Times and Extenders on Deep Freezing of Buffalo Semen. *Theriogenology* 16: (1) 99-104.
63. Lindorf, E. (1973) The influence of B-amylase and B-glucuronidase on the fertility of frozen bull semen. *Vet. Rec.* 93:70-78.
64. Macpherson, FW. (1957) Goat's milk as a semen diluent. *Canadian. J. Comp. Med.*, 21:161-162.
65. Marco regulatorio para el tratamiento de la genética animal de bovinos, caprinos, ovinos, équidos y porcinos en el MERCOSUR. Capitulo 5 Normas sobre temas vinculados Decreto 165/000, de 31 de mayo de 2000.
66. Maule, J. (1962) *The semen of animals and artificial insemination.* CAB. Farnham Royal, Bucks. 420 p.
67. Maxwell, WM., Stojanov T. (1996) Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:1013-1020.

68. Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 247: 125-142.
69. Meyer, RD., Barth, AD. (2001) Effect of acrosomal defects on fertility of bull used in artificial insemination and natural breeding. *Can. Vet. J.*, 42 (8), 630-4.
70. Muiño, R., Fernandez, H., Areal, H., Viana, JL., Lopez, M., Fernandez, A., Peña, AI. (2005) Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, Vol. 101 (3), 175-191.
71. Muiño, R., Pena A.I., Rodriguez A., Tamargo C., Hidalgo C. (2009) Effects of Cryopreservation on the Motile Sperm Subpopulations in Semen from Asturiana de los Valles Bulls. *Theriogenology* 72: 860-868.
72. Muiño R., Fernandez M., Pena A. I. (2007) Post-thaw Survival and Longevity of Bull Spermatozoa Frozen with an Egg Yolk-based or Two Egg Yolk-free Extenders after an Equilibration Period of 18 h. *Reprod Dom Anim* 42: 305-311.
73. Mousa M., Martinet V., Trimeche A., Taintured D., and Anton M. (2002) Low Density Lipoproteins Extender from Hen egg yolk by an Easy Method: Cryoprotective Effect on Frozen-Thawed Bull Semen. *Theriogenology*, 57: 1695-1706.
74. Parks, J. E. and Graham, J. K. (1992) Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
75. Perry, E. (1960) *The Artificial Insemination of Farm Animals*. 3a. ed. Rutgers University Press. New Brunswick, 430 p.
76. Repartido de teriogenologia, (1998) Facultad de Veterinaria. Montevideo, 18 pp.
77. Roberts, SJ. (1979) *Obstetricia Veterinaria y Patología de la Reproducción (Teriogenología)*. Hemisferio Sur. Buenos Aires: 1079 p.
78. Rodriguez, O. L., Brentson, W. E., Ennen, B. D. and Pickett, B. W. (1975) Effects of Rates of Freezing, Thawing and Level of Glycerol on the Survival of Bovine Spermatozoa in Straws. *J. Anim. Sci.* 41, 129-136.
79. Rodríguez-Martínez, H. (1999) Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal, pp.: 302-316.
80. Rodríguez-Martínez, H. (2001) Analyses of sperm function by in vitro methods. 2º Simposio Biotecnologías Aplicadas en Reproducción Animal.
81. Salamon, S., Maxwell, WM. (2000) Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:77-111.
82. Salisbury, G., Van Demark, N., Lodge, J. (1978) *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. 2a. ed. Freeman, 798 p.

83. Schunemann, H., Grant, B.J., Freudenheim, J.L., Muti, P., Browne, R.W., Drake, J.A., Klocke, R.A., Trevisan, M. (2001) The relation of se-rum levels of antioxidant vitamins C and E retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 163:1246-1255.
84. Schwenke, D., Behr, S. (1998) Vitamin E combined with selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations. *Circ. Res.* 83:366-377.
85. Shannon, P. (1962) Effect of addition of volatile fatty acids on the viability and fertility of diluted Bovine Semen. *Nature*, 196:1225-1226.
86. Shin, S., Lein, D., Patten, V., Ruhnke, H. (1988) A new antibiotic combination for frozen bovine semen, control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis* and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology*; 29:77-91.
87. Sommer, D., Fakata, K., Swanson, S., Stemmer, P. (2000) Modulation of the phosphatase activity of calcineurin by oxidants and antioxidants in vitro. *Eur. J. Biochem.* 267:2312-2322.
88. Thun, R. (2002) Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 57:1087-1094.
89. Thundathil, J., Palasz, At., Barth, AD., Mapletoft, R. (2002) Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*, 58 (1), 87-102.
90. Ticiano G. L. (2010) Effects of Extender and Equilibration Time on Post-Thaw Motility and Membrane Integrity of Cryopreserved Gyr Bull Semen Evaluated by CASA and Flow Cytometry. *Animal Reproduction Science* 120: 31–38.
91. Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., Panfili, E. (1998) Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59:753-758.
92. Vallecillo Hernandez A.F (2011) Caracterización reproductiva de toros de la raza Marismeña como base a su conservación, Tesis doctoral, España 1-243 pp. Disponible en: [www.uco.es/img/07\\_11\\_40\\_Texto\\_tesis\\_doctoral\\_colgar.pdf](http://www.uco.es/img/07_11_40_Texto_tesis_doctoral_colgar.pdf)
93. Van Lieshout, Jah. (1995) Report on the AI qualivet group. Proc. 7<sup>th</sup> European AI Vets Meet, The Netherlands, 1-40.
94. Vazquez, I., Cortes, S., Borque, C. (1998) Conservación del Semen de Macho Cabrio. *Producción Ovina y Caprina*, XXIII: Ponencia 2, pp: 31-36.
95. Vishmenath, R., Shannon, P. (2000) Storage of Bovine Semen in Liquid and Frozen State. *Animal Reproduction Science* 62: 23-53.

96. Watson, P.F. (1979) The Preservation of Semen in Mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology, Finn, C.A. (ed), Oxford University Press, Oxford, pp 283-350.
97. Watson, P. F. (1995). Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of Their Post-Thawing Function. *Reprod. Fert. Dev.* 7: 871-891.
98. Woelders, H., Zuidberg C.A., Hiemstra, S.J. (2003) Applications, limitations, possible improvements and future of cryopreservation for livestock species, in: Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe, editor: D. Planchenault, Paris 2003. 67-76.