

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**RELEVAMIENTO DE LABORATORIOS DE PROCESAMIENTO
DE SEMEN BOVINO EN URUGUAY**

Por

Br. CURBELO CURBELO Miguel
Br. RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ Zelmar

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria y
Producción Animal

MODALIDAD: Estudio de caso

MONTEVIDEO
URUGUAY
2013

PAGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente:

Dr. Daniel Cavestany

Segundo Miembro:

Dr. Daniel Elhordoy

(Tutor)

Tercer Miembro:

Dr. Álvaro López

Cuarto Miembro:

Dr. Pedro Bañales

(Co- Tutor)

Fecha:

Autores:

Br. Miguel Curbelo

Br. Zelmar Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecerle a nuestro tutor, Dr. Daniel Elhordoy, por su apoyo y confianza, quien nos orientó en este trabajo, nos brindó su tiempo, experiencia y sus conocimientos.

Al Dr. Pedro Bañales quien fue nuestro co-tutor que también nos ayudó en el armado de los cuestionarios y nos permitió acceder a los laboratorios.

A los veterinarios de libre ejercicio y veterinarios responsables de los centros, quienes con su colaboración fueron fundamentales para la realización de esta tesis.

A las funcionarias de la biblioteca de Facultad de Veterinaria por su asesoramiento, especialmente a Ruth por el tiempo y dedicación que nos brindó.

Y especialmente a nuestras familias quienes nos apoyaron en todo momento.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
TABLA DE CONTENIDO.....	7
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	13
Reseña histórica.....	13
Congelación e inseminación artificial a nivel mundial.....	13
Congelación e inseminación artificial en Uruguay.....	14
Espermatozoides.....	16
Colección de semen bovino.....	18
Vagina artificial.....	18
Masaje transrectal.....	19
Electroeyaculador.....	20
Técnicas de evaluación de semen fresco.....	23
Pruebas macroscópicas.....	24
- Volumen.....	24
- Aspecto.....	24
- Olor.....	24
- Color.....	24
- Densidad.....	25
- Motilidad en masa macroscópica.....	25
- pH.....	26
- Cuerpos extraños.....	26
- Schalm test.....	26
Pruebas microscópicas.....	26

- Motilidad en masa microscópica.....	26
- Motilidad individual.....	27
- Vigor.....	30
- Concentración.....	30
- Coloración post vital.....	33
- Morfología y acrosomía.....	35
- Test de fertilización in vitro.....	39
- Citometría de flujo.....	39
- Valores de calidad aceptables.....	39
- Sanidad del toro donante.	40
Criopreservación.....	43
Crioprotectores.....	43
Mecanismo de acción.....	43
- Crioprotectores intracelulares.....	44
- Crioprotectores extracelulares.....	45
Principios de la preservación de semen.....	46
Eventos físicos de la criopreservación.....	47
Almacenamiento de semen.....	48
Acción de ROS en células espermáticas.....	50
Peroxidación lipídica.....	50
Adición de antioxidantes a diluyentes.....	51
Congelación y descongelación.....	52
Fundamentos de la congelación.....	52
Consecuencias físicas y químicas.....	53
Proceso de congelación.....	54
- Diluyentes.....	54
- Funciones de un diluyente.....	54
- Tipos de diluyentes.....	55
- Componentes básicos de los diluyentes para congelación.....	55

- Calculo de dilución.....	56
- Enfriado	57
- Glicerolización.....	57
- Equilibración.....	58
- Envasado en pajuelas	58
- Congelación.....	58
Proceso de descongelación.....	59
Evaluación post descongelado.....	60
Pruebas microscópicas.....	60
- Motilidad individual.....	60
- Vigor.....	61
- Acrosomía.....	61
- Morfología.....	61
- Concentración.....	61
- Test de termorresistencia.....	61
- Estabilidad e integridad de membrana.....	62
- Sanidad.....	64
- Valores de aceptabilidad	64
HIPOTESIS.....	65
OBJETIVOS.....	65
MATERIALES Y METODOS.....	66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXO I.....	91
ANEXO II.....	96

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1. Vagina artificial bovina armada y lista para la colección del semen.
- Figura 2. Arriba el colector agarra el pene a través de la vaina prepucial y lo dirige hacia la abertura de la VA. Abajo el pene del toro penetra la VA antes del salto eyaculatorio final.
- Figura 3. Maniquí móvil diseñado para colección de semen con VA.
- Figura 4. Colección de semen con un maniquí móvil. El colector con la VA está sentado en el interior del maniquí.
- Figura 5. Equipo completo de electroeyaculación.
- Figura 6. Colección de semen por electroeyaculación.
- Figura 7: Incremento de la fertilidad con valores crecientes de semen de toro hasta que se alcanza el umbral de fertilidad óptima.
- Figura 8: Relación entre la tasa de preñez y el número de espermatozoides inseminados.
- Figura 9: Arriba sistema CASA, abajo vista de un análisis de motilidad mediante sistema CASA.
- Figura 10: Comparación entre las concentraciones espermáticas viables en pajuelas pre y post congelado de LPS en Uruguay.

LISTA DE TABLAS:

- Tabla 1. Aspecto del eyaculado correlacionado a la concentración.
- Tabla 2. Valoración de la motilidad masal macroscópica
- Tabla 3. Escala de la motilidad en masa microscópica
- Tabla 4. Correlación entre concentración y densidad.
- Tabla 5. Escala basada en el porcentaje de células móviles
- Tabla 6. Escala del vigor del movimiento ondulado de los espermatozoides
- Tabla 7: Parámetros de aceptabilidad para congelación seminal.
- Tabla 8: Nivel de riesgo de transmisión de enfermedades del bovino en IA
- Tabla 9: Parámetros de aceptabilidad para evaluación de semen post descongelado.
- Tabla 10. Métodos y régimen de colecta empleados por los LPS.
- Tabla 11: Pruebas de evaluación y valores de referencia adoptados para semen fresco por los centros que procesan semen en Uruguay.
- Tabla 12: Pruebas realizadas por los centros para la evaluación del semen después de descongelado.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue conocer las principales técnicas laboratoriales utilizadas y los patrones mínimos de calidad adoptados por los laboratorios procesadores de semen (LPS) entre los que se incluyen centros de procesamiento de semen (CPS) bovino registrados en el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) y profesionales veterinarios de libre ejercicio especializados en reproducción, en referencia al análisis de calidad de las muestras disponibles en el mercado. Esta investigación realizada en forma de encuesta y/o entrevista, recolectó datos de siete de los quince encuestados, siendo observada una gran variabilidad en los métodos y patrones adoptados. En base a los datos obtenidos fue posible constatar la falta de estandarización en los análisis sobre la calidad biológica del semen bovino, lo que permite plantear la discusión sobre la necesidad de uniformizar técnicas y criterios de evaluación con la finalidad de lograr una mayor calidad de las muestras comercializadas en el país y consecuentemente, mejores resultados cuando son utilizadas en diferentes biotecnologías reproductivas. Se describen las técnicas de recolección de semen, procesamiento, congelación y evaluación de las muestras, luego de su descongelado para poder predecir la fertilidad potencial de las mismas mediante su evaluación, a través de las pruebas más comúnmente usadas en los laboratorios.

SUMMARY

The objective of this work was to know the main laboratory techniques used and the minimum quality standards adopted by laboratories processing semen (LPS) among including bovine semen processing centers (SPC) registered at the Ministry of Livestock, Agriculture and Fisheries (MGAP) and veterinary professionals specialized in reproduction, in reference to quality analysis of the samples available in the market. This research in the form of survey and/or interview, collected data from seven of the fifteen respondents, being observed a great variability in the methods and standards adopted. Based on the data obtained it was possible to note the lack of standardization in the analysis of the bovine semen biological quality, allowing to focus the discussion on the need to standardize techniques and evaluation criteria in order to achieve a higher quality of samples marketed in the country and consequently better results when used in different reproductive biotechnologies. We describe techniques for semen collection, processing, freezing and evaluation of samples after thawing to predict their fertility potential by evaluating them through tests commonly used in laboratories.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético de los animales de granja se ha beneficiado enormemente del uso de la inseminación artificial (IA). El desarrollo, perfeccionamiento y aplicación de la IA, lo que representa la primera generación de biotecnologías reproductivas, no sólo ha hecho posible la distribución de material genético en todo el mundo a bajo costo, sino que también ha contribuido en gran medida a frenar la propagación de enfermedades venéreas (Gil, 1999).

La utilización de semen bovino congelado representa la principal biotecnología reproductiva para el mejoramiento genético animal (Arruda et al., 2000; Freitas et al., 2009). Este impacto no habría sido posible sin la congelación acertada de semen de toro. Es posible ahora, a través de su uso, inseminar vacas con un toro superior en cualquier parte del mundo, aun luego de su muerte (Bailey et al., 2000). Además, se ha hecho posible el uso de semen de toro genéticamente superior en la inseminación de varias miles de vacas, mucho más de lo que alguna vez se pudo suponer con el uso de semen líquido.

El semen congelado en pajuelas de 0,25ml o 0,5ml se ha convertido en la unidad universalmente aceptada de almacenamiento y transferencia de genética bovina a los productores de ganado (Baracaldo et al., 2007).

La evaluación laboratorial de semen congelado bovino representa un componente fundamental de los programas de reproducción animal, garantizando la calidad de las muestras destinadas a trabajos de inseminación artificial, múltiples ovulaciones transferencia de embriones (MOTE) y producción de embriones in vitro (PIV) (Crespilho et al., 2009).

La evaluación de semen es un componente importante, complementaria a la exploración clínica, para estimar la capacidad potencial de un toro como reproductor. Esta evaluación tiene un valor diagnóstico para evaluar la función testicular y epididimal, y/o la normalidad del tracto genital del macho, que nos ayuda a identificar casos claros de infertilidad o incluso de potencial sub fertilidad. Además, la evaluación de una muestra de semen puede determinar su potencial capacidad fecundante antes de ser utilizado para inseminación artificial (AI) o en fertilización in vitro (FIV) (Rodríguez-Martínez, 2006).

La valoración de la calidad seminal, es una de las herramientas de análisis más empleadas en la clasificación de los machos para el servicio por monta directa o programas de inseminación artificial, gracias al cual se forma una opinión del potencial de fertilidad del toro de ese momento, ya que la calidad seminal puede cambiar bastante y rápidamente, dependiendo de si un toro está pasando o recuperándose de un proceso que afecte la espermatogénesis (Barth, 2001).

La preservación eficiente de las células espermáticas con su completa capacidad de fertilizar es el objetivo principal del proceso de criopreservación de semen. Sin embargo, hay una pérdida significativa en el potencial de fecundación de las muestras congeladas usando las técnicas más corrientes (Watson, 2000; Cooter et al., 2005).

El proceso de criopreservación representa una interrupción artificial del progreso del espermatozoide post eyaculación hacia la maduración y la fertilización (Januskauskas et al., 2002).

Son numerosos los efectos que la criopreservación puede inducir en los espermatozoides, que van desde lesiones letales hasta aquellas que solo alteran la función posterior. En los últimos años, el aumento considerable en la comprensión tanto de la fisiología celular del espermatozoide y de las tensiones de la criopreservación ha contribuido a un renovado interés en la mejora del rendimiento de semen criopreservado. Hoy en día, las aplicaciones biotecnológicas de criopreservación disfrutan de un interés que no tiene precedentes.

El proceso de criopreservación reduce la viabilidad del espermatozoide 50 a 60 %, y causa varias alteraciones bioquímicas y estructurales que implican distintos compartimentos de la célula espermática (Chaveiro et al., 2006). Según González (2004), aproximadamente el 85 % de los espermatozoides bovinos presente en una muestra seminal sufre algún tipo de daño durante la congelación o en el procedimiento de descongelado.

La interrupción de la capacitación y/o la reacción del acrosoma comprometería severamente el potencial de fertilización de los espermatozoides, lo cual tal vez explique las tasas de fertilidad observadas en la práctica, de semen congelado, que estarían correlacionadas con la habilidad de los espermatozoides para moderar los niveles de calcio intracelulares (Bailey et al., 1994).

Durante la espermatogénesis, los espermatozoides pierden muchos de los organelos que poseen la mayoría de las células somáticas (como el retículo endoplásmico, los lisosomas, y la mayor parte del citoplasma) con el fin de reducir el "equipaje" que necesitan para llevar en el camino al óvulo. La función principal de un espermatozoide, fertilizar un ovocito, es un conjunto integrado de procesos, que requieren múltiples atributos celulares. Por lo tanto, aunque el espermatozoide contiene pocos organelos, sigue siendo una célula compleja, que tiene múltiples compartimentos celulares, composiciones de membrana, y las estructuras subcelulares, todas las cuales deben funcionar correctamente para que el espermatozoide pueda fertilizar un ovocito (Graham, 2001).

Es de especial interés para el profesional, que en la espermatogénesis, el ADN de la célula es condensado de tal manera que los genes no pueden ser expresados, por lo tanto el espermatozoide no puede sintetizar proteínas. Esto significa que la célula no puede repararse de daño celular que se produce naturalmente o debido a intervenciones del hombre (manipulación de semen, refrigeración o crioconservación). La manipulación indebida de los espermatozoides los puede dañar permanentemente, tornándolos infértiles (Graham, 2001).

Las células espermáticas deben presentar motilidad, actividad mitocondrial, la membrana celular y el acrosoma integridad total y el núcleo deberá estar condensado, permitiendo la interacción con el tracto genital femenino y la fertilización (Rodríguez-Martínez, 2000; Graham, 2001).

Debido a la naturaleza compartimental de las células espermáticas y el daño que implica la criopreservación, las evaluaciones de laboratorio que con exactitud pueden determinar la viabilidad de muestras de semen son vitales. La calidad de

semen bovino influye considerablemente en la tasa de no retorno y tasas de fertilización, en programas de inseminación artificial (Santos, 2003; Phillips et al., 2004b). Esto es uno de los factores más importantes para la correcta producción de ganado; y justamente en esto se basa la fundamentación de la presente tesis.

Por ser una célula compleja, los espermatozoides se vuelven infértiles cuando uno de sus factores bioquímicos o morfológicos está afectado. La evaluación de solo uno de estos aspectos no garantiza la condición de normalidad del otro, por lo tanto la combinación de varios factores es un análisis multifactorial más apropiado para el diagnóstico de funcionalidad e integridad del espermatozoide (Melo y Henry, 1999).

Actualmente los métodos de evaluación utilizados en centros de colecta y procesamiento de semen consisten básicamente en el análisis subjetivo de motilidad (antes y después del estrés térmico), concentración, morfología e integridad de las membranas plasmáticas y acrosomal (Crespilho et al., 2009).

Trabajos preliminares realizados en otros países han mostrado grandes discrepancias entre varios LPS en cuanto a técnicas de laboratorio empleadas para la evaluación de calidad de semen (Phillips et al., 2004a; Crespilho et al., 2009). Sin embargo, no mucho se sabe en cuanto a procedimientos y estándares adoptados por los LPS en Uruguay.

En Uruguay existen importantes laboratorios que colectan, envasan y congelan semen de los mejores ejemplares de cada raza bovina y para eso utilizan modernas tecnologías de congelación, sin embargo no existen antecedentes de ningún estudio con respecto a las evaluaciones de semen en LPS y los diferentes procedimientos que se llevan a cabo. Tampoco existe ninguna normativa en la legislación en lo que respecta a valores de referencia y técnicas empleadas para el análisis de las muestras que son destinadas al comercio interno, a pesar de su importancia.

El Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) a través de la Sección de Reproducción de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) es quien regula los centros de toros registrados y habilitados para la congelación de semen destinada a la exportación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

RESEÑA HISTORICA

Congelación e inseminación artificial a nivel mundial

En 1677 Antón Van Leeuwenhoek y su pupilo John Hann, descubrieron los espermatozoides con el uso de “lentes de aumento”, refiriéndose a una innumerable cantidad de cuerpos minúsculos, a los que llamaron “animáculos”, los cuales se movían con fuerza (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. 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 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).

El investigador ruso y líder pionero en la inseminación artificial fue Ivanoff. En 1899 fue requerido por el jefe del Royal Russian Stud para determinar las posibilidades del método para su uso en equinos. También intentó la técnica en pájaros.

Ivanoff fue el primero en tomar la iniciativa de realizar la inseminación en el ganado vacuno y lanar. Ivanoff estuvo a la cabeza del Ministerio de Agricultura 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).

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).

Posteriormente, Milovanov en 1938 utilizó los reportes de Amantea en sus intentos de desarrollo de la vagina artificial para toro, padrillo y carnero.

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 1940 los americanos Phillips y Lardy desarrollaron un diluyente a base de citrato de sodio y yema de huevo que permitió extender el volumen de semen y prolongar su vida útil 48 a 72 hs.

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°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 “bufferado” 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). En 1952, en nuestra facultad disertó el Dr. Polge y poco después el Dr. Parkes, quienes ratificaron el éxito de sus investigaciones, anunciando que en Inglaterra ya se inseminaba con semen congelado (Duran del Campo, 2001).

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. También éste mismo año, McEntee comunica que el agregado de antibiótico al semen congelado evita la infección con *Campylobacter fetus* a las hembras susceptibles (Perry, 1960).

En 1964 los japoneses Nagase y Niwa presentaron un método de congelación en pellet o pastillas que básicamente consistía en que una gota de semen diluida en diluyente glicoglicerolado y yema de huevo se depositaba sobre agujeritos hechos en la superficie de piedras de hielo seco. Se congelaba en segundos conservando intacta la movilidad de millones de espermatozoides.

Mientras tanto Cassou en Francia crea 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).

Congelación e inseminación artificial en Uruguay

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).

Fue en los primeros años de la década del 40 el Dr. Juan C. Gutiérrez Fabre realizaba los primeros trabajos de inseminación en ovinos. Y en 1943 el Dr. Jaunsolo realiza los primeros trabajos en vacunos.

En 1956 surge la formación de una empresa de congelación -Banco de Semen Congelado- BASEMCO.

Se comenzó a congelar semen en 1956. La operación comenzaba con la extracción de semen, su evaluación, dilución en un medio glicoglicerolado, enfriamiento durante 4 horas (período de equilibración), pipeteado en ampollas de 2ml que se cerraban a la lámpara y luego se disponían en canastos especiales donde eran inmersas en alcohol rectificado al 95% a 5°C el que con el agregado de pequeños trocitos de hielo seco se iban enfriando hasta congelar el material seminal. Terminada la operación, el semen congelado se conservaba en hielo seco en grandes heladeras. Fue a partir de este mismo año que se habilitó la importación de semen.

En 1964 fue que los japoneses Nagase y Niwa presentaron un método de congelación en pellets o pastillas. Fue un año después que en Uruguay se puso en práctica esta técnica. A partir de entonces la inseminación tomó nuevo impulso y buenos resultados.

Por lo tanto se comenzó a utilizar nitrógeno líquido contenido en bioconservadores, estos últimos se obtenían mediante importación de semen (a título de envase), ya que no estaba habilitada la importación de termos para nitrógeno (recién alrededor de 1968/70) aunque sí podían ingresar conteniendo semen.

En el año 1965 Duran del Campo congela pastillas de semen de toros de alta calidad genética de esa época y treinta años después el semen es reevaluado in vitro e in vivo obteniendo buenos resultados en cuanto a calidad y porcentaje de preñez (Bonadonna, 1989).

El nitrógeno era obtenido como producto de desecho de la producción de oxígeno por parte de la compañía CINOCA (Industrias Nacionales Oxígeno, Caños y Acero S.A.) la que no siempre contaba con stock de N₂ para la venta con los problemas que ello conllevaba para el mantenimiento del semen. Posteriormente en 1977 la Cía. sueca AGA (Aktiebolaget Gas Accumulatie) derivó su producción de oxígeno, también a nitrógeno.

En 1977 los uruguayos Dr. Rafael Cash y Dr. Aníbal Durán del Campo encontraron un método que permite congelar pellets en N₂. Tras muchos ensayos llegaron a la conclusión que el mejor resultado era dado con una superficie de acrílico y a una altura de 5cm del N₂. Este procedimiento se extendió rápidamente entre los colegas ya que hace la congelación mucho más práctica y económica. Hasta el 2001 no se había empadronado el invento ya que los creadores olvidaron hacerlo 24 años antes. La técnica se mantiene hasta hoy con mínimas variaciones (Duran del Campo, 2001).

ESPERMATOZOIDES

Los espermatozoides (gametos masculinos) forman parte de la suspensión celular líquida llamada semen, que también se conforma por secreciones procedentes de testículos, epidídimos y glándulas accesorias del aparato reproductor masculino (plasma seminal).

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. En dichos túbulos se encuentran las células germinales que finalmente se convertirán en los gametos masculinos.

Los espermatozoides maduros se dividen según su estructura anatómica en cabeza (conteniendo el núcleo) y cola (permite su motilidad).

Contiene un acrosoma, estructura de doble pared, que es una estructura ubicada entre la membrana plasmática (que recubre al espermatozoide) y la porción anterior de la cabeza. Un cuello une la cabeza con la cola (flagelo), la cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal.

Cabeza: Contiene al núcleo aplanado oval donde se aloja la cromatina compactada, formada por ADN y protaminas (proteínas). El número acrosómico del ADN es haploide, o sea que posee la mitad de cromosomas que el núcleo de las células somáticas de la misma especie.

Acrosoma: Es un delgado saco membranoso de doble capa, ubicado sobre el núcleo. Contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas, que participan en el proceso de fecundación fusionándose a la membrana del ovocito.

Cola: se subdivide en cuello y segmentos medio, principal y caudal.

Desde una placa basal ubicada en el cuello nacen nueve fibras gruesas que se proyectan hasta el anillo citoplasmático (ubicado entre el segmento medio y el principal). En el segmento medio nace el axonema que comprende nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. Esta disposición (9+2) está rodeada por las nueve fibras gruesas antes mencionadas, durante su paso por el segmento medio.

El axonema y las fibras gruesas están cubiertas por una vaina mitocondrial que es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática.

Gota protoplásmica o citoplasmática: Está compuesta por citoplasma residual. Suele desprenderse de los espermatozoides tras el eyaculado, aunque puede retenerse en la región del cuello (gota proximal) o cerca del anillo citoplasmático (gota distal).

Los espermatozoides testiculares son transportados desde el testículo a través de un conducto contorneado llamado epidídimo.

En su paso por éste, los espermatozoides experimentan un proceso de maduración, adquiriendo capacidad potencial de fecundar óvulos. Estos cambios se asocian a aspectos de la integridad funcional de los espermatozoides: a) desarrollo del potencial para la motilidad progresiva sostenida, b) modificación de los patrones metabólicos y el estado estructural de organelos específicos de la cola, c) cambios en la cromatina nuclear, d) cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática, e) movimiento y pérdida de la gota citoplasmática, f) modificación de la forma del acrosoma (en algunas especies).

Para que no exista un metabolismo innecesario por parte de los espermatozoides madurados, las células que recubren el epidídimo secretan “factores de inmovilidad” prolongando así la supervivencia de los espermatozoides.

Estos son almacenados mayormente en la porción caudal del epidídimo siendo éstos ya maduros los que pueden ser eyaculados. Si bien este ambiente les es favorable para su supervivencia, no serán preservados por tiempo indefinido. Los espermatozoides no eyaculados se eliminan de forma gradual por excreción en la orina (Graves, 1978; Garner y Hafez, 2000).

COLECCIÓN DE SEMEN BOVINO

En general, para que un toro de una compañía de IA pueda ser autorizado para la colección y congelamiento de semen, el animal debe ser aprobado mediante un examen físico completo de salud general y reproductiva y debe pasar las pruebas sanitarias locales obligatorias que buscan detectar posibles enfermedades contagiosas.

A pesar de que existan gran cantidad de métodos para recolección de semen bovino, nos referiremos a los tres métodos más utilizados en la práctica que son la vagina artificial, el electroeyaculador y el masaje transrectal.

Vagina Artificial (VA)

Este método es casi el único utilizado en los centros de IA, por razones prácticas y porque produce eyaculados más fisiológicamente parecidos a los naturales (Baracaldo et al., 2007). Además de permitir una adecuada excitación sexual del macho, lo que permite obtener semen de buen volumen y alta concentración espermática. Con intervalos cortos de 10-15 minutos se pueden obtener hasta 4 eyaculados.

La vagina artificial es una construcción simple y simula la copula natural. La unidad proporciona temperatura adecuada, presión y fricción que favorece la eyaculación (Ax et al., 2000b).

Consta de un cilindro de goma dura exterior que contiene un revestimiento interior de látex que se reinvierte en sus extremos. En una parte de la vagina artificial se coloca una extensión de látex cónica que lleva un tubo de vidrio graduado (Arthur et al., 1991).



Figura 1. Vagina artificial bovina armada y lista para la colección del semen. (Cortesía de Minitube International). Disponible en: www.ivis.org

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, siendo la cantidad de agua necesaria, inversamente proporcional al tamaño del pene. Durante la recolección, la temperatura interna de la vagina artificial debe estar entre 42 – 50 °C que se cree la temperatura ideal. Puede también insuflarse aire para aumentar la presión. Finalmente puede utilizarse algún gel estéril que no dañe a los espermatozoides. Con respecto a la temperatura del agua, el operario debe tener en cuenta el tiempo de espera entre el llenado con agua de la vagina artificial y la colecta, así como la temperatura ambiente, ya que es normal que la vagina comience a enfriarse (Arthur et al., 1991; Ax et al., 2000b; Barth, 2007).

Se recomienda una estimulación previa que consiste de 3 a 5 montas falsas y restricción activa. Luego de esto se permite al toro montar a la hembra excitadora.

La persona a cargo de la recolección desvía el pene del toro a la vagina artificial la cual se mantiene paralela al flanco de la hembra. Al tener contacto con la superficie tibia y lubricada, el toro eyacula de inmediato en la vagina artificial. Al eyacular, la VA debe ser inclinada de inmediato hacia abajo, en dirección al tubo de ensayo. El semen drena al tubo de recolección, que entonces se retira y se coloca en baño de agua que se ha mantenido a 34°C, antes de medirse la concentración de espermatozoides (Ax et al., 2000b).

Toros jóvenes o que no están acostumbrados a utilizar vagina artificial, tal vez necesiten una hembra en estro para que el procedimiento sea exitoso (Barth, 2007).

Son muy importantes las prácticas higiénicas cuando se recoge semen de los toros. 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, 1989).



Figura 2. Arriba: El colector agarra el pene a través de la vaina prepucial y lo dirige hacia la abertura de la VA.
Abajo: El pene del toro penetra la VA antes del salto eyaculatorio final. (Fotos cortesía de Gencor - The Genetics Corporation). Disponible en: www.ivis.org



Figura 3. Maniquí móvil diseñado para colección de semen con VA (Cortesía de Minitube International). Disponible en: www.ivis.org



Figura 4. Colección de semen con un maniquí móvil. El colector con la VA está sentado en el interior del maniquí (Cortesía de Minitube International). Disponible en: www.ivis.org

Masaje transrectal

Para realizar la técnica de masaje, el operador debe introducir su mano en el recto y luego de la exanimación de las glándulas accesorias y los anillos inguinales, se aplica un masaje longitudinal de atrás hacia adelante sobre la ampolla, la próstata y periódicamente sobre la uretra. Estimular las glándulas vesiculares parecería tener menor importancia. Cuando el músculo de la uretra comience las contracciones, el operador debe tratar de masajear en sincronía con ellas y continuar el masaje hasta

producirse la eyaculación, pero si no se colecta luego de 2 a 3 minutos de masajes usualmente el procedimiento será infructuoso (Morrow, 1986).

El semen recogido por este método puede estar contaminado con orina, tiene una proporción demasiado elevada de secreción de la vesícula seminal o bien tiene sus componentes menos equilibrados que el eyaculado normal (Salisbury et al., 1978).

El masaje transrectal, es una técnica que no puede usarse en todo tipo de toros, sobre todo por su temperamento habiendo en algunos casos falta de protrusión del pene que resulta en contaminación desde el prepucio, e irritación de la mucosa rectal por la excesiva frotación manual. No es menor destacar que el número de toros al cual se les puede aplicar este método es limitado, no solo por lo explicado anteriormente, sino porque es un procedimiento extenuante para el operador que realiza el masaje.

Ventajas:

1. No se requiere tener un equipo costoso.
2. Esta técnica evita el dolor potencial ocasionado por técnicas como la electroeyaculación.

Desventajas:

1. Se requiere de un operador con gran destreza en palpación por vía rectal del tracto reproductivo de los toros.
2. La libido, la capacidad de apareamiento, la función eréctil del pene y la capacidad de eyaculación no son evaluadas con esta técnica
3. Las muestras de semen pueden contaminarse con células epiteliales, bacterias o impurezas, especialmente cuando la muestra seminal gotea del prepucio o a lo largo de los pelos prepuciales.
4. El volumen y la concentración del semen obtenido son muy variables.

Electroeyaculador

El electroeyaculador es un aparato eléctrico que provee una estimulación rectal que desencadena la erección y eyaculación. Está formado esencialmente por: transformador, reóstato electrodo bipolar, voltímetro.

Previo a su utilización debe realizarse un examen transrectal de los órganos internos y anillo inguinal, la uretra pélvica debe ser masajeadada por 30 a 60 segundos. El área sobre la ampolla, próstata y uretra se debe masajear con movimientos de adelante hacia atrás con dirección longitudinal. Dicha estimulación debería facilitar la colección de semen mediante el electroeyaculador.

El recto debe estar vaciado de materia fecal, y debe prevenirse la introducción de aire en el mismo. El desarrollo de la estimulación consiste en aumentar gradualmente el voltaje; al principio debe de ser bajo, las glándulas bulbouretrales descargan, a esto le siguen unas descargas más grandes de las vesículas seminales y próstata, y finalmente después de 18 a 20 estimulaciones y normalmente a un voltaje de 15 caen gotas de semen. La estimulación debe durar 1 o 2 segundos con 0,5 segundos sin estimulación entre medio. La descarga seminal

normalmente acontece de forma pasiva pero de manera ocasional existe una erección del pene y orgasmo. La estimulación normalmente es continuada hasta obtener 2 a 5 ml de semen (Arthur et al., 1991; Barth, 2007).

El electroeyaculador permite extraer semen a todos los toros sin previo acostumbramiento especialmente en animales indómitos, con afecciones de los miembros posteriores que le impiden cubrir la hembra o en el caso de examen de infertilidad de varios animales (Arthur et al., 1991).

Algunos toros pueden segregar excesivo líquido seminal durante la electroeyaculación, lo que da como resultado semen con una baja concentración de espermatozoides (Bonadonna, 1989).

Los electroeyaculadores están diseñados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir erección peneana y eyaculación. Un sistema de electroeyaculación está constituido por los siguientes componentes: la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de batería, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el envase de colección (fig. 5).



Figura 5. Equipo completo de electroeyaculación (Cortesía de Minitube International). Disponible en: www.ivis.org

La mayoría de los toros eyaculan al recibir un estímulo eléctrico menor a 9 voltios. Si un toro no ha eyaculado después de recibir el nivel más alto de estimulación con el electroeyaculador, pueden efectuarse 3 a 4 estimulaciones con el nivel máximo, seguidas por un período de descanso de 1 a 2 minutos manteniendo siempre la sonda dentro del recto (Salisbury et al., 1978).

La situación ideal para restringir los movimientos de un toro que va a ser sometido a electroeyaculación, es ubicar el animal en un cepo, pero sin necesidad de atrapar la cabeza del toro en la compuerta anterior del mismo. El riesgo que existe es que cuando la cabeza del toro se atrapa, existe una mayor tendencia a que el animal caiga durante el procedimiento.



Figura 6. Colección de semen por electroeyaculación. Cortesía del Dr. Albert Barth. Disponible en: www.ivis.org

Usando un equipo apropiado y una buena técnica, sólo alrededor del 2% de los toros con fertilidad normal fallan en emitir semen por esta técnica. Se considera que la

electroeyaculación sin anestesia es dolorosa para los toros, y su uso es controversial en algunos países.

Los mugidos durante la electroeyaculación, y la elevación de la progesterona y cortisol de origen adrenal después de efectuar el procedimiento son considerados como una evidencia del dolor ocasionado por la técnica. Por lo tanto, el procedimiento debe realizarse sólo por personal con entrenamiento adecuado y siempre en la forma más adecuada y con la menor estimulación posible (Salisbury et al., 1978).

TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO

Desafortunadamente no se puede proporcionar una predicción precisa de la fertilidad, aunque sí es cierto que probablemente muestras problemáticas se pueden distinguir (Holt y Van Look, 2004).

Es generalmente aceptado que hay una conexión entre la fertilidad del semen y sus propiedades mensurables. El objetivo de la evaluación de semen es de predecir la capacidad fecundante del mismo lo más acertadamente posible. Muchos métodos diferentes han sido evaluados a lo largo de las décadas pasadas, pero sólo pocos métodos han sido adoptados para el trabajo práctico. La mayor parte de estos estudios han usado las evaluaciones sencillas microscópicas de clásicos parámetros espermáticos, incluyendo la concentración de esperma, motilidad, morfología y viabilidad (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

Tal como lo ha reportado Salisbury en 1978, una vez que se alcanza el valor óptimo en la valoración del semen, el incremento posterior de los valores del carácter no produce un incremento paralelo en la fertilidad (fig. 7).

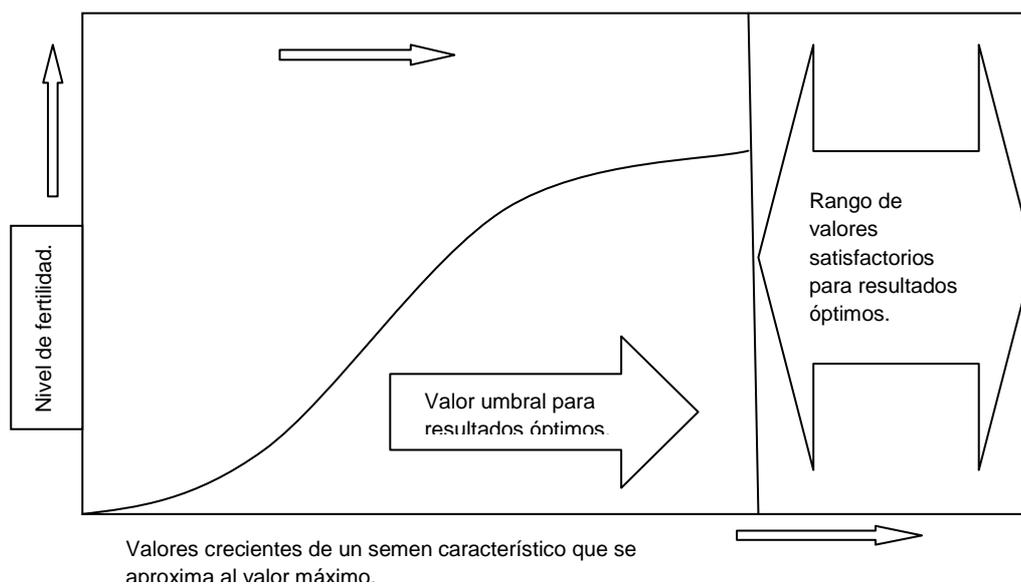


Figura 7: Incremento de la fertilidad con valores crecientes de semen de toro hasta que se alcanza el umbral de fertilidad óptima (Salisbury et al. 1978).

En definitiva el objetivo de todos estos intentos de medir la calidad del semen es garantizar que la fertilidad de dicho semen se halla dentro del rango normal. A veces se confunden los términos “calidad de semen” y “fertilidad”. No son sinónimos, aunque se han realizado muchos esfuerzos a lo largo de los años, con cierto éxito, para hacer que ambas coincidan más estrechamente (Salisbury et al., 1978).

Procesamiento:

Tener preparado baño maría con tubos de citrato de Na, eosina, platina térmica del microscopio conectado y con portaobjeto. Es recomendable realizar dos extendidos por muestra, e identificarlos correctamente. La técnica de evaluación de semen

fresco se divide en pruebas macroscópicas y microscópicas que se describen a continuación.

Pruebas macroscópicas

Inmediatamente después de la extracción debe hacerse un examen macroscópico del semen eyaculado en el tubo de colecta. Dicho examen comprende la anotación del volumen, color, densidad, motilidad en masa macroscópica, pH, cuerpos extraños y Schalm test (Elliot, 1978).

Volumen:

Normalmente tiene un amplio rango que va de 2-12ml. Se debe tener en cuenta que para toros mayores de 2 años el mínimo esperable son 4ml. Los animales jóvenes y los de menor talla dentro de una especie producen menor volumen de semen. La elevada frecuencia de eyaculación reduce el volumen promedio y cuando se obtienen dos eyaculados consecutivamente, el segundo suele tener menor volumen. El que éste sea reducido no es perjudicial, pero si se acompaña de concentración espermática baja, por lo que el resultado total disminuirá. Se le llama aspermia a la ausencia de eyaculado, hipospermia a un volumen reducido e hiperespermia al volumen aumentado (Ax et al., 2000a).

Aspecto:

El eyaculado como tal, es un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento, que contiene una suspensión de espermatozoides en un medio llamado plasma seminal (Ax et al., 2000a).

Tabla 1. Aspecto del eyaculado correlacionado a la concentración (Ax et al., 2000a).

Aspecto	Valor descriptivo	Número de spz estimado (spz/mm ³)
Creimoso espeso	Muy buena	> 750.000
Lechoso	Buena	400-750.000
Leche aguachenta	Regular	250-400.000
Traslucida	Pobre	<250.000

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).

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.

Posee una coloración blanquecina o ligeramente amarillenta y su opacidad se halla en función de la concentración espermática.

Los toros pueden producir semen de color amarillo debido a la presencia inocua de riboflavina por las glándulas vesiculares y ampollas del conducto deferente, no teniendo ningún tipo de significación clínica. Esto no debe confundirse con orina, la cual tiene su olor característico (Ax et al., 2000a).

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). Recordemos que la presencia de pus indica inflamación, y que la orina es espermicida. Y que la sangre contiene eosinófilos, que presentan una enzima (amilasa) que destruye los factores de capacitación producidos en el epidídimo.

Motilidad en masa macroscópica

Es un dato subjetivo 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).

En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal, definida como movimientos en ondas y remolinos del total de espermatozoides de la muestra.

En la siguiente tabla se describe el sistema de clasificación donde normalmente se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimientos rápidos y vigorosos, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas. También se puede clasificar mediante cruces.

Tabla 2. Valoración de la motilidad masal macroscópica (Bonadonna, 1989).

		Movimiento en ondas
+++	5/5 y 4/5	Movimientos masivos muy marcados y rápidos
++	3/5	Movimientos en masa aparentes, pero moderados
+	1/5 y 2/5	Ondas en movimientos apenas aceptables
-	0	No hay ondas, semen sin movimiento

pH:

El pH del semen de toro recientemente eyaculado depende de las proporciones variables de las diversas secreciones implicadas. La mayoría de las muestras normales se hallan en el lado ácido de la neutralidad, oscilando desde pH 6,5 al de 6,9, con una media de 6,75 (Derivaux, 1976). Este parámetro no varía mucho en las

distintas especies animales. Aunque el pH varía en un rango amplio, desde, alrededor de 6,0 o más bajo a 8,0 o ligeramente mayor.

El semen de buena calidad es generalmente mas ácido (pH inferior) que el semen con concentraciones más bajas de células espermáticas. El semen de mala calidad contiene una cantidad proporcionalmente mayor de líquido procedente de las glándulas uretrales y accesorias.

Puesto que los espermatozoides descomponen la fructosa del semen en ácido láctico en las condiciones anaerobias que generalmente existen en los estrechos tubos de recogida, el pH del semen disminuye con el tiempo transcurrido entre la recogida y la determinación (Salisbury et al., 1978; Ax et al., 2000a).

Cuerpos extraños:

La muestra debe estar libre de polvo, tierra, pasto, heces, pelo y otros contaminantes. Debe desecharse el semen con fragmentos de material extraño; estos generalmente decantan al fondo del tubo. La presencia de alguno de éstos contaminantes es indicadora de una mala técnica de extracción de semen (Ax et al., 2000a).

Schalm test

Se realiza para detectar la presencia de leucocitos, pero sólo en casos que se sospeche la presencia de los mismos. No se hace de rutina en cada evaluación. La prueba se basa en el mismo principio del California mastitis test.

Pruebas microscópicas

Motilidad en masa microscópica:

El movimiento en masa depende de tres factores: concentración, porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides. Cuando uno de estos tres factores se encuentra disminuido, las ondas rápidas en remolinos esperadas son severamente deprimidas o eliminadas. Por ejemplo, una muestra con un 80% de motilidad individual puede no tener prácticamente ondas por una baja concentración o por baja velocidad de movimiento. O una muestra con una muy buena concentración y un alto porcentaje de movimiento progresivo individual puede producir poco o nada de movimiento de onda si la velocidad de los espermatozoides ha sido disminuida por temperaturas frías o por haber transcurrido un largo intervalo entre la colecta y la evaluación. Por lo tanto, la motilidad masal debe ser interpretada cuidadosamente.

La determinación de la motilidad masal se hace utilizando una gota de semen puro de 5 a 10 mm de diámetro, colocada sobre un portaobjeto atemperado y sin cubreobjetos. La observación se realiza bajo un campo luminoso con un aumento de 40X (lupa). Se evalúa la presencia de ondas cerca del borde de la gota. (Bonadonna, 1989). Y se clasifica basándonos en el porcentaje de células móviles según la siguiente escala:

Tabla 3. Escala de la motilidad en masa microscópica (Bonadonna, 1989).

		Movimiento en ondas	Valor descriptivo
+++	5/5 y 4/5	Corrientes turbulentas o vertiginosas que se mueven muy rápidamente	Muy buena
++	3/5	Ondas lentas	Buena
+	1/5 y 2/5	Movimientos singulares o esporádicos y ninguna actividad de masa	Regular
-	0	Necrospermia o inmovilidad total.	Mala

Se consideran aceptables para utilizar semen fresco un nivel de regular-buena, mientras que para su congelación el parámetro para ser aceptado sería de nivel bueno - muy bueno (Tribulo et al., 2002).

Densidad

Este parámetro permite predecir de forma subjetiva mediante una escala (tabla 1) la concentración espermática o sea el número de espermatozoides por mm^3 o cm^3 . El semen debe tener un aspecto opaco y relativamente uniforme, indicativo de alta concentración de células espermáticas (Ax et al., 2000a).

Tabla 4. Correlación entre concentración y densidad (Dpto. Teriogenología, 2000).

	Criterio evaluativo	Descripción	Número de spz estimados
DD	Densísimo	Se observan los spz superpuestos	$> 1.500.000 \text{ spz/mm}^3$
D	Denso	El campo óptico está lleno de spz y entre ellos no existen espacios.	$800 - 1.500.000 \text{ spz/mm}^3$
SD	Semidenso	Campo visual con espacios intermedios entre los spz del tamaño de una cabeza.	$800 - 500\text{spz/mm}^3$
R	Ralo	Espacios libres amplios.	$500-200\text{spz/mm}^3$
O	Oligospermia	Spz separados por grandes espacios.	$< 200\text{spz/mm}^3$
A	Azoospermia	No se observan spz.	Ausencia

Motilidad individual:

La estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra de semen es el análisis más comúnmente hecho de rutina. Su importancia es debida al peso que tiene esta característica sobre la fertilidad (Graham y Mocé, 2005).

Por lo tanto la motilidad es un reflejo de la actividad flagelar, sin embargo no necesariamente garantiza que esa célula sea fértil; según Roberts (1979), la integridad del material genético en la cromatina del espermatozoide también debe ser preservada para lograr un desarrollo embrionario normal luego de la fertilización. Más allá de esta salvedad, mientras los espermatozoides con actividad flagelar normal son capaces de cruzar la unión útero-tubárica y entrar en el oviducto, los espermatozoides con función flagelar anormal son incapaces de hacerlo (Holt y Van Look, 2004).

La motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles (astenozoospermia), o ausencia de motilidad, debería ser automáticamente descartado para su conservación. Esta puede no solo verse alterada sino también suprimida como es el caso de espermatozoides muertos o en presencia de bajas concentraciones de productos químicos tales como metales pesados (Roberts, 1979; Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte espermático sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación.

Cuando se diluye el eyaculado o se descongelan dosis de semen congelado, se debe estimar el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivos o no progresivos). Las dosis descongeladas con una motilidad progresiva inferior al 40 % se deberían descartar.

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez- Martínez, 2000; Phillips et al., 2004a), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford et al., 1976).

Es importante destacar el papel que cumplen los objetos que intervienen como el aparato recolector, dado que agresiones tales como calor, frío o contaminación química como residuos de jabón o sustancias químicas que son transportadas por los dedos sobre el recolector o portaobjetos, pueden inmovilizar los espermatozoides.

El método de colección, la condición corporal, la circunferencia escrotal y la edad del toro hacen variar el porcentaje de espermatozoides móviles. Se ha reportado en toros jóvenes, colectados por la técnica de masaje rectal y con circunferencias escrotal mayores a 31 cm un porcentaje de motilidad espermática individual de 51.4+/-18% (Elhordoy et al., 2010).

El semen a su vez puede estar contaminado con orina durante la electroeyaculación o contener pus. Eyaculaciones repetidas pueden resultar en una mejor motilidad espermática en aquellos toros que no han eyaculado por un largo tiempo. Cuando el semen es diluido para estimar la motilidad individual, se debe tener especial cuidado en que tanto el diluyente como la temperatura del semen, del portaobjetos y cubreobjetos deben estar a 37°C (Morrow, 1986; Tribulo et al., 2002).

Según Morrow (1986) la prueba puede hacerse diluyendo el semen tanto en suero fisiológico, como en solución de citrato de sodio. La prueba de rutina para esta evaluación es con el semen diluido en Citrato de Na al 2.92%. Se coloca una gota gruesa de semen, de aproximadamente 30 ó 40 microlitros en un tubo con unos 2ml.

de la solución de Citrato que debe estar a la misma temperatura del semen, ya en el Baño María. Una vez diluido el semen se extrae una gota de la dilución y se la coloca sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C y se coloca sobre ésta un cubreobjetos, también a la misma temperatura. Se observa al microscopio, siempre sobre la platina térmica.

Debe ser observada a un aumento de 200 x – 500 x. Se debe observar un campo y valorar subjetivamente los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación. Los espermatozoides que giran en círculo o avanzan en forma oscilatoria se consideran que tienen movimientos anormales. El porcentaje que se obtiene es el de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo sobre el total de los espermatozoides observados.

Generalmente basándonos en la escala del porcentaje de células móviles (tabla 4) se aceptan como valor mínimo 50% de espermatozoides móviles para utilizar como semen fresco y 70% si se desea congelar.

Tabla 5. Escala basada en el porcentaje de células móviles (Dpto. Teriogenología, 2000).

Porcentajes de motilidad individual.	
5/5	80 y 100% de spz con movimiento rectilíneo uniforme
4/5	60 y 80% de spz con movimiento rectilíneo uniforme
3/5	40 y 60% de spz con movimiento rectilíneo uniforme
2/5	20 y 40% de spz con movimiento rectilíneo uniforme
1/5	20 % o menos de spz con movimiento rectilíneo uniforme

Es posible observar diversos patrones de movimiento. Los patrones generales de motilidad espermática en el semen diluido se presentan en un patrón de semiarco largo. El diluyente puede alterar un poco la motilidad, por lo general incrementando la velocidad de medición. Después de la dilución inicial, un porcentaje elevado de los espermatozoides puede mostrar un patrón de movimiento circular, que por lo general se resuelve después de 5 a 10 minutos en el diluyente.

Si los espermatozoides nadan en movimiento circular estrecho, ello significa que tal vez sufrieron choque por frío. El movimiento oscilatorio podría definirse como células envejecidas o en proceso de secarse. Los patrones de motilidad también se correlacionan con la fertilidad o subfertilidad en machos. La motilidad es rutinariamente evaluada por estimación visual del porcentaje de células móviles, por lo cual el resultado es subjetivo.

Para la evaluación objetiva (no sesgada) de la motilidad espermática se han desarrollado varios procedimientos, como la fotomicrografía de tiempo, la reproducción de videomicrografía cuadro por cuadro, la espectrofotometría y el análisis computarizado. Los sistemas de análisis de semen asistido con computadora (CASA) se utilizan en laboratorios de referencia como medio objetivo para la valoración del movimiento espermático. Las descripciones de motilidad con CASA incluyen:

1. Velocidad curvilínea
2. Velocidad promedio de recorrido
3. Velocidad en línea recta
4. Amplitud del desplazamiento cefálico lateral

5. Linealidad
6. Frecuencia de cruce
7. Desplazamiento angular medio
8. Área de recorrido de la cabeza espermática
9. Tiempo que cada espermatozoide es registrado

En general, el uso de sistemas automatizados proporciona al usuario de información objetiva. Sin embargo actualmente los sistemas disponibles son caros y algunos están sujetos a taras por ajustes subjetivos de los parámetros. Es sobre todo por su elevado costo que su utilización de rutina en laboratorios comerciales se vea limitada (Den Daas, 1992; Zavos et al., 1996; Ax et al., 2000a).

Vigor:

La velocidad de movimiento de los espermatozoides, denominado vigor, es la velocidad con que éstos atraviesan el campo. Esta puede ser evaluada al mismo tiempo que se hace la motilidad individual, y se clasifica bajo la siguiente escala.

Tabla 6. Escala del vigor del movimiento ondulado de los espermatozoides (Ax et al., 2000a).

Grado	Nivel de movimiento
5	Movimiento progresivo muy rápido, cel. difícil de seguir visualmente
4	Movimiento progresivo rápido
3	Movimiento progresivo continuo a velocidad lenta
2	Lento movimiento de cola con algo de movimiento progresivo
1	Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo
0	Sin movimiento

Normalmente se acepta un valor mínimo de 3, tanto para semen fresco como para congelar.

Existen análisis por sistemas de computación que miden objetivamente % de motilidad progresiva, vigor, concentración espermática y el número de spz/mm³.

Concentración:

La determinación exacta del número de espermatozoides y el volumen del eyaculado define el número de hembras que pueden ser inseminadas. La concentración del eyaculado es de 2×10^8 espermatozoides/ml en toros jóvenes, a $1,8 \times 10^9$ espermatozoides/ml en los maduros (Ax et al., 2000a).

Este parámetro no solo está influido por la edad, sino por el método de colección, la condición corporal, desarrollo sexual, madurez del toro, régimen de alimentación, estado de salud reproductiva, tamaño de los testículos y la época del año. Elhordoy et al (2010), reportaron en toros Hereford de 18 meses con baja condición corporal, una concentración promedio de $3,7 \times 10^8$ espermatozoides/ml.

Saacke (2008) a través de una gráfica (fig. 10) muestra como el semen de toros individuales varía en la máxima tasa de no retorno y en el tiempo al que se consigue la máxima fertilidad con el aumento de la concentración de espermatozoides por pajuela.

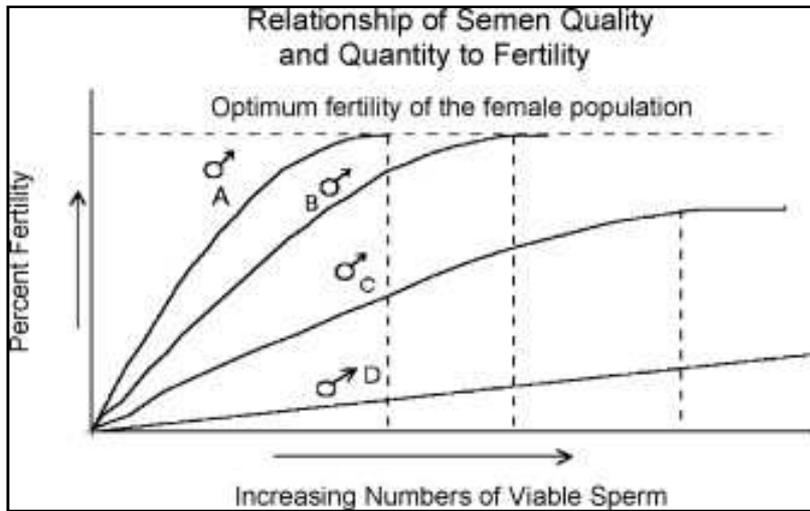


Figura 8: Relación entre la tasa de preñez y el número de espermatozoides inseminados (Saacke, 2008. Modificado de Sullivan y Elliott).

La concentración espermática se puede medir usando cámara de Neubauer, turbimetría o espectrofotómetro. En el caso del hematocitómetro la cantidad de espermatozoides por cámara se cuenta manualmente, lo cual, pese a tomar mucho tiempo, es muy exacto (Elliot, 1978; Ax et al., 2000a). En la siguiente tabla se muestra la denominación para diferentes concentraciones.

Opacimetría (turbimetría):

Con el fin de obtener una técnica que demuestra una mayor repetibilidad tanto para la motilidad espermática y para la morfometría, diversos sistemas utilizando un análisis de imagen computarizado se ha desarrollado y empleado. Programas computarizados para la evaluación del esperma pueden ser más objetivos e imprimir repetibilidad en las calificaciones con mayor capacidad que el ser humano para identificar patrones de motilidad y espermatozoides normales. El poder de analizar este tipo de prueba se da por la evaluación precisa y exacta de espermatozoides con alto grado de objetividad, y por lo tanto puede mejorar el proceso de evaluación seminal (Arruda, 2000; Versteegen et al, 2002.).

Método de la Cámara Cuentaglóbulos (espermaticómetro):

Para evaluar la concentración, se deben matar previamente los espermatozoides y así poder contarlos. Esto se logra preparando previamente una solución salina formolada al 2%. Se colocan 10 microlitros de semen puro en 2ml. de solución salina formolada (1/200) y se homogeniza invirtiendo. Luego se toman aproximadamente 14 microlitros y se carga la Cámara de Neubauer (portaobjetos de microscopio que cuenta con cámaras numeradas de precisión) por capilaridad, (14ul por cada retículo, llenar los 2 retículos).

Una vez cargada, se debe dejar reposar unos minutos para permitir que todos los espermatozoides decanten y se ubiquen en un mismo plano para poder contarlos. Luego se procede a ubicar el retículo de glóbulos rojos a 100 aumentos, y una vez localizado, se pasa a 400 aumentos para realizar el conteo. Se cuentan todos los espermatozoides que se encuentren en las 4 cuadrículas de las puntas y la central (5 en total). Se cuentan los retículos de ambos lados de la cámara y se saca el promedio. Al número de espermatozoides que conté, lo multiplico por 10.000(*) y así obtengo la cantidad de espermatozoides por milímetro cúbico de semen.

(*) El factor de corrección se obtiene de multiplicar la inversa de la dilución por la inversa de la profundidad de la cámara por el total de cuadrículas pequeñas que posee el retículo, dividido el número de cuadrículas pequeñas que cuento en las 5 cuadrículas grandes.

$$10 \times 200 \times 400 / 80 = 10.000$$

Se consideran aceptables los siguientes valores:

Para congelación $\geq 750.000\text{spz/mm}^3$

Para rodeo general 500.000spz/mm^3 (fresco) (Tribulo et al. 2002).

Método de análisis de semen asistido con computadora (CASA):

En un intento de reducir esta incertidumbre, un gran variedad de biotécnicas han sido desarrollado para crítica seminal, de los cuales uno de ellos es el sistemas evaluación informatizada de las características seminales (CASA) (Arruda et al., 2007). Desde hace varias décadas numerosos investigadores (Amann y Hammerstedt, 1980; O'Connor et al., 1981; Arruda et. al. 2007) han dedicado mucho trabajo 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 que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que su precio se fue haciendo más asequible. En consecuencia, comenzaron a utilizarse cada vez con más frecuencia en veterinaria, especialmente en la especie bovina, tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria, en los centros de IA.

Un sistema CASA consta de varias unidades interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo. Aunque los principios básicos utilizados para el análisis de las imágenes digitalizadas son similares en los diferentes sistemas CASA que existen en el mercado, hay diferencias apreciables en sus sistemas ópticos, técnicas de captura de imagen y reconocimiento espermático, algoritmos utilizados para la reconstrucción de trayectorias y determinación de las medidas cinéticas, y también en el manejo y análisis de los datos, y consecuentemente, en los resultados finales (Irving, 1995; Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen et al., 2002).

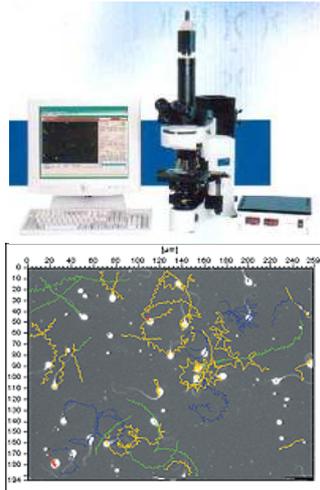


Figura 9: Arriba sistema CASA, abajo vista de un analisis de motilidad mediante sistema CASA. Disponible en: www.ivis.org

Coloración post vital:

Se ha reconocido durante las últimas décadas que una de las principales características que discriminan células muertas de las vivas es la pérdida de la función de transporte y la integridad física de la membrana plasmática. Sobre la base de este fenómeno, un conjunto de ensayos de viabilidad celular han sido desarrollados. Por ejemplo, la membrana de células vivas intactas excluye una variedad de colorantes, tales como azul de tripano o yoduro de propidio.

La incubación con estos colorantes resulta en la tinción de las células muertas, mientras que en las células vivas muestran una captación mínima del colorante.

La combinación de colorantes para la tinción vital tales como azul de tripano-giemsa, eosina-nigrosina o eosina-azul de anilina (el más clásico) y algunos otros son ampliamente utilizados para diferenciar vivos de muertos (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

Usando eosina y azul de anilina provee un fondo oscuro (azul de anilina) tiñéndose las células de eosina. Esta última penetra la membrana de las células dañadas tiñendo las lesiones y los espermatozoides no viables de rosa (células muertas), en cambio las células viables repelen la eosina y aparecen blancas (células vivas).

Simplemente se aplica 10ul de semen en el portaobjetos y se mezcla por 20 segundos con 30ul de eosina, posteriormente se realiza el frotis y se lo observa a 400X. Se cuentan por lo menos 100 espermatozoides tomando la precaución de observar varios campos diferentes. Un valor mínimo aceptable es de 70% de espermatozoides vivos.

Las tinciones eosina-azul de anilina o de eosina-nigrosina poseen una osmolaridad de 90-100 mosm/l. No se puede agregar un sistema buffer a estas porque sino las sales precipitarían y oscurecerían los espermatozoides. Un shock hipotónico sobre los espermatozoides vivos es fácilmente inducido con esta técnica y esto puede ser minimizado secando los extendidos tan pronto como sea posible. El efecto producido por el shock hipotónico es fácilmente reconocido por la apariencia de látigo de la

porción terminal de la parte principal de la cola del espermatozoide. Es menos común que se curve la porción intermedia distal (Barth y Oko, 1989).

Morfología y acrosomía:

El estudio de la morfología espermática es muy importante a los fines de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anomalías. Nuestro interés sobre la morfología espermática radica en que ésta tiene gran impacto sobre la fertilidad del ganado. Lagerlof, en 1934, fue uno de los primeros en mostrar que el incremento de la prevalencia de anomalías espermáticas está asociado con un decrecimiento en la fertilidad. El estrés por calor daña grandes cantidades de espermatozoides, y los periodos de temperatura ambiental elevada, combinados con índices altos de humedad, pueden hacer al macho estéril hasta por seis semanas. Es posible que aparezcan cantidades grandes de espermatozoides anormales en los eyaculados recolectados en el periodo de recuperación. Debe proporcionarse sombra adecuada y agua fría limpia para ayudar a minimizar los efectos del estrés por calor (Morrow, 1986; Ax et al., 2000a).

El acrosoma es un lisosoma esencial para la función de la célula espermática, que cubre las dos terceras partes de la porción anterior de la cabeza espermática. La reacción acrosómica tiene lugar en el sitio de la fertilización y es activada por condiciones locales o por unión específica de enzimas contenidas en el lisosoma. O sea que las enzimas contenidas en el acrosoma permiten que el espermatozoide capacitado penetre el óvulo. Por lo tanto un alto porcentaje de células que tienen acrosoma intacto y por ende ser capaces de realizar la reacción acrosómica, es considerado como una característica seminal importante (Sullivan, 1978; Den Daas, 1992; Ax et al., 2000a).

Metodología:

Se pueden usar técnicas de frotis secos o húmedos de un solo paso como la tinción con Rosa Bengala donde todos los espermatozoides se ven rosas sobre un fondo limpio, mientras que con Tinta China el fondo es oscuro y los espermatozoides permanecen sin teñirse y aparecen blancos.

Otra técnica, recomendada por Saacke (1970) donde también podemos observar los acrosomas, consiste en colocar una gota de aproximadamente 30 microlitros de semen diluido sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se realiza el frotis en forma firme y pareja. Se deja secar el frotis y se lo tiñe con una solución de Giemsa. Se dejan incubar con el colorante por 4 horas, se lo retira y se enjuaga y se lo deja secar. La evaluación de la morfología y la acrosomía se realiza bajo aceite de inmersión a 1000 aumentos. Los espermatozoides se visualizan de color violáceo y en el caso de tener presente su acrosoma se puede apreciar de un violáceo más intenso, si éste se encuentra ausente, la cabeza del espermatozoide se observa de un color homogéneo o con el tercio superior más claro.

Actualmente es generalizado el uso de la microscopia de contraste de fase con formol salino bufferado o glutaraldehído al 0,2% que fija las membranas y evita su posterior deterioro (Dpto. de Teriogenología, 1998).

Para morfología un conteo de 100 células es satisfactorio cuando no existen problemas mayores. Cuando un gran número de defectos espermáticos está

presente, hasta 500 células deben ser contadas para obtener un espermiograma preciso.

El “Análisis de asistencia de la morfología espermática” (ASMA), es otro método que puede ser utilizado para determinar los efectos de la criopreservación en el esperma de toros. Con el ASMA, es posible subdividir las muestras en tres sub muestras en cuanto al tamaño de la cabeza espermática con una diferencia significativa de 0,001 entre cada categoría, clasificándolas en pequeñas, medianas y grandes.

Rubio-Guillén et al. (2009) concluyeron que existen diferencias entre tamaños importantes en las muestras de semen, que a su vez varían con el tipo de proceso de enfriado y/o congelado.

En la actualidad se utilizan las normas ISO 9002 de calidad para centros de inseminación artificial a nivel mundial establecida por el Departamento de Medicina del Rodeo y la Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá, creadas por Barth (2000), las que establecen identificar la ubicación de la malformación y tener en cuenta los siguientes parámetros:

Se estima como valor mínimo aceptable 75% de acrosomas normales y también 75% de espermatozoides normales (sin malformaciones). Pero este máximo de 25% de malformaciones espermáticas permitido, debe contemplar un límite máximo de defectos del núcleo (cabeza) del espermatozoide que se encuentre en el rango de 15-20%, mientras que defectos del acrosoma y la cola se pueden tolerar hasta 25% (Saacke, 1970; Catena y Cabodevila, 1999; Tribulo et al., 2002).

Malformaciones espermáticas:

Primarias y secundarias:

Por definición se consideran anomalías “primarias”, aquellas que ocurren y/o tienen su origen durante la espermiogénesis dentro del testículo, mientras que las anomalías “secundarias”, se originan dentro del epidídimo o en el laboratorio. Sin embargo los defectos tanto primarios o secundarios son igualmente importantes como indicadores de un mal funcionamiento testicular. Por ende, esta clasificación evalúa origen, no severidad.

Elhordoy y Haedo en 1983 consideran que la clasificación de las anomalías en primarias y secundarias además de obsoleta presenta algunas dificultades, tales como la gota proximal que se clasifica como secundario porque se creía originada en un disturbio de la función del epidídimo, aunque Rao en 1971 reportó que es originado por defectos en la espermatogénesis en los testículos, por lo cual debería ser primario. Lo mismo pasa con el defecto de cabezas sueltas, las que pueden darse por una alteración de la base que conecta la cabeza del espermatozoide con la porción media del capitulum (siendo por lo tanto un defecto primario), o se puede dar por una función anormal del epidídimo (siendo un defecto secundario) (Elhordoy, D. comunicación personal).

Blom en 1977 desarrolló un método nuevo de clasificación que consistía en separar los defectos en “mayores” a aquellos que se encuentran directamente asociados a infertilidad o malformaciones, y en “menores” a aquellos que no lo están (Salisbury, 1978).

En 1994 Saacke ideó un sistema de clasificación más complejo, llamándole “defectos compensables” a aquellos espermatozoides anormales que no son transportados al oviducto, y a aquellos que son transportados pero no son capaces de penetrar la zona pelúcida, no evitando que otro fertilice, y entonces que pueden ser compensados por un incremento de la dosis espermática. Un ejemplo de ello son los espermatozoides con problemas de locomoción. Mientras que a aquellos otros espermatozoides perfectamente capacitados para llegar al ovocito y realizar el bloqueo de la polispermia, pero que no pueden continuar el proceso de fertilización se los llamo “defecto no compensable”, ya que por más que aumente la concentración, el % de espermatozoides con defecto es el mismo, no pudiendo compensar. Ejemplo de esto son los espermatozoides con vacuolas nucleares (defecto de diadema). La presencia de este tipo de defectos suele ser la causa de baja fertilidad dado que, luego de la fertilización, se desarrollan embriones de mala calidad que mueren durante los primeros días de gestación.

A continuación se destacan algunas características de los principales defectos encontrados:

Cabezas piriformes y angostas:

Zona posacrosomal más angosta. Los espermatozoides con formas piriformes obvias (de pera) son anormales. En la mayoría de los casos se encuentran estas anomalías junto con otras e indican un defecto de espermatogénesis.

Microcefalia y macrocefalia:

Existe una gran variación de formas y tamaños. Aunque ésta es bastante común, generalmente se encuentran en proporción muy pequeña. La mayoría de estas células mueren o son fagocitadas por las células de Sertoli antes del llegar al estadio de espermátide. Esta es la razón por la cual no se encuentran en altos porcentajes en el extendido de semen.

Vacuolas nucleares:

Las vacuolas nucleares se encuentran primariamente como una línea en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (defecto “diadema”). Aparentemente los espermatozoides con este defecto pueden ser transportados normalmente hacia el oviducto y pueden ser capaces de penetrar la zona pelúcida y la membrana vitelina, y producir el bloqueo de la polidesmina. Sin embargo este defecto es incompatible con el desarrollo embrionario.

Formas teratoides:

Variaciones de las formas teratoides que aparecen cuando existe una espermatogénesis anormal. Estas formas anormales producidas por disturbios en la espermatogénesis pueden ser confundidas con células inflamatorias. Estos espermatozoides defectuosos tienen generalmente una condensación de ADN anormal, un núcleo pequeño y deforme, y en la mayoría de los casos la pieza principal enrollada alrededor del núcleo. Las formas teratoides son generalmente encontradas con una incidencia de hasta 2% en semen normal. En muestras de toros con disturbios en la espermatogénesis su incidencia está entre el 5 y 10%.

Defectos de acrosoma:

En este defecto nos encontramos con un acrosoma aumentado de tamaño (generalmente conteniendo un quiste y un cuerpo de inclusión) que se pliega en la región apical de la cabeza del espermatozoide. Con la tinción de eosina-nigrosina se ve que la mayoría de los espermatozoides tienen la región apical chata o una pequeña invaginación. Este defecto ha sido observado en animales Holando y fue relacionado con un gen recesivo, por lo tanto es aparentemente heredable en esta raza y tal vez en otras. Los espermatozoides con este defecto no pueden penetrar la zona pelúcida.

Cabezas sueltas:

Se pueden encontrar espermatozoides decapitados en pequeño número en semen normal. Este defecto puede ser producido por envejecimiento o por un defecto de implantación de la cola en la placa basal. Cuando se encuentra en mayor cantidad, están asociados con defectos en la termorregulación del testículo y en estos casos es producido, aparentemente, por un defecto en la espermiogénesis. En los casos de toros muy gordos el defecto se encuentra asociado con otros defectos espermáticos.

Las cabezas sueltas y muchos espermatozoides muertos se encuentran en toros con una acumulación del semen en la cola del epidídimo. Normalmente los espermatozoides envejecidos son eliminados de la cola del epidídimo a través de un movimiento peristáltico hacia la uretra. Toros con defecto en el mecanismo de transporte tienen una gran acumulación de espermatozoides muertos y viejos en la cola del epidídimo.

Aplasia segmentaria de la pieza intermedia y defectos de la vaina mitocondrial:

Estos pequeños defectos en las mitocondrias no afectan notablemente la motilidad espermática pero representan un lugar frágil que pueden terminar en fracturas de la pieza media. Raramente se encuentran en alta incidencia.

Colas abaxiales, accesorias y múltiples:

Algunas anormalidades de cola pueden tener su origen en los testículos de los toros con o sin fertilidad disminuida, pero una mayor prevalencia de anormalidades de cola, es generalmente el resultado de disfunción epididimal (Morrow, 1986).

Estas anormalidades están usualmente asociadas entre sí, sin embargo las colas abaxiales son las más comunes, no produciendo reducción de la fertilidad.

El defecto de cola accesoria es poco común y aparentemente hereditaria. Las colas accesorias están generalmente presentes junto con colas abaxiales y colas dobles. No se sabe si espermatozoides con colas accesorias tienen reducida su capacidad de fertilizar el óvulo.

La cola es un cilio especializado que se desarrolla del centriolo proximal y distal. El caso de colas múltiples se produce cuando se forman más de un cilio a partir de una replicación de los centriolos.

Defecto "Dag":

Es la separación de la cubierta y de las fibras del axonema en la región de la pieza media. La pérdida de la cubierta que recubre estas fibras resulta en la fractura, explosión, corte y torsión de la pieza media, típicas del defecto Dag. Éste puede ser

debido a disturbios de la espermatogénesis. No obstante, es un defecto hereditario por un gen recesivo de la raza Jersey y posiblemente de la Hereford.

Espermatozoides de cola corta:

Este defecto no es común, es aparentemente heredable y asociado con un gen recesivo.

Pieza principal doblada:

Se ve normalmente que la pieza doblada hace un rulo inmediatamente distal al ángulo. En la mayoría de los casos se ve una gota citoplasmática distal en el centro del rulo. Este defecto aparentemente se origina en el epidídimo y no hay que confundirlo con el defecto producido por el shock hipotónico o por estrés por frío de los espermatozoides (no del toro).

Piezas intermedias arqueadas:

Tienen forma de arcoíris o de U. Es producido por la tinción pero puede haber algunos casos raros de toros. Cuando evaluamos la motilidad individual vemos una gran cantidad de espermatozoides con movimientos en círculo.

Gota citoplasmática proximal:

Casi todos los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del epidídimo tienen una gota citoplasmática proximal. Luego, a medida que van descendiendo hacia la cola del epidídimo vemos que el 90% de los espermatozoides tienen esta gota citoplasmática en la parte distal. Este defecto se puede ver en animales jóvenes que no han completado la pubertad. En toros adultos es causa de disturbio epididimal o testicular. Se puede observar un aumento 7 a 10 días después del estrés en toros adultos afectándose los espermatozoides que se encontraban transitando el epidídimo. Algunas anomalías primarias como cabezas piriformes están aparentemente predispuestas a retener la gota citoplasmática proximal. Se considera un defecto mayor, por afectar directamente la fertilidad.

Gota citoplasmática distal:

Entre el 65 y 95% de los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo tienen la gota citoplasmática en esta posición. Esta gota es liberada cuando los espermatozoides se mezclan con los fluidos seminales en la eyaculación, a causa de un factor hemolítico en las vesículas seminales. Aparentemente este defecto no afecta la fertilidad.

Células medusa:

Éstas son células epiteliales ciliadas provenientes del conducto eferente y se pueden encontrar en bajas cantidades en muestras de semen de toros con defectos graves de la función testicular. Generalmente la muestra de semen es muy diluida y puede ser necesario centrifugarla para concentrar los espermatozoides y poder verlos. Denotan daño testicular grave.

Glóbulos blancos:

Su presencia está asociada con procesos inflamatorios en la ámpula, glándulas accesorias o epidídimo. También puede deberse a infecciones de pene y de prepucio. Generalmente los casos que aparecen son en toros jóvenes. También se los puede identificar con contraste diferencial pero es preferible utilizar tinciones

como Hematoxilina y eosina, Wright-Giemsa u otras específicas para estas células (Rao, 1971).

Barth en 2005 propone quitar importancia a los sistemas de clasificación, el aconseja enumerar los defectos e interpretar las anomalías a la luz del conocimiento actual y como afecta la fertilidad (Elhordoy, D. comunicación personal)

Test de fertilización in vitro (FIV)

La fertilización in vitro de ovocitos homólogos es sin lugar a dudas el test más completo para evaluar la funcionalidad espermática, ya que permite valorar todas las fases del proceso de fecundación, desde el estado de capacitación espermática hasta la fusión con la membrana vitelina del ovocito o el inicio del desarrollo embrionario (Shamsuddin y Larsson; 1993; Ward et al., 2002).

Aunque en algunos estudios se ha encontrado una elevada correlación con la fertilidad in vivo de los toros (Zhang et al., 1995), todavía se necesita una mayor estandarización de los métodos a la hora de aplicar dicha técnica, puesto que existe considerable variabilidad entre los resultados de FIV obtenidos para un mismo toro, debido a factores de variación como por ejemplo el método de selección de los espermatozoides (percoll o swim -up) (Parrish et al., 1995), de capacitación espermática in vitro (Saeki et al., 1995) o el número de espermatozoides utilizados para la inseminación de los ovocitos (Kroetsch y Stubbings, 1992).

Citometría de Flujo:

La citometría de flujo es una técnica que permite identificar, cuantificar y separar las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra de células en suspensión, en función de los distintos patrones de tinción adquiridos tras el marcaje con diferentes colorantes fluorescentes, que se unen a estructuras celulares específicas o se acumulan selectivamente en compartimentos intracelulares.

A lo largo de las dos últimas décadas, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la investigación de poblaciones espermáticas. Se han desarrollado muchos métodos de tinción y combinaciones de fluorocromos, se han comercializado muchos fluorógenos nuevos, que permiten analizar una gran variedad de funciones espermáticas, y como resultado, hoy en día, el uso de esta técnica ofrece la posibilidad de analizar múltiples características espermáticas, simultáneamente en la misma muestra de semen, de una forma rápida, precisa y objetiva.

Debido al creciente número de parámetros analizables y al desarrollo de citómetros a un coste accesible, se ha extendido su uso tanto en laboratorios de investigación como en centros de IA. Entre las características espermáticas más frecuentemente analizadas para el control de calidad del semen bovino se incluyen el estudio de la viabilidad espermática, de la integridad acrosomal y de la funcionalidad mitocondrial, así como la investigación del estado de capacitación de los espermatozoides. Además, la citometría de flujo también permite obtener muestras de espermatozoides sexados, bien para su uso en IA o en fecundación in vitro (Garner et al., 1983; Pinkel et al., 1985; Johnson et al., 1989).

Valores aceptables:

Para que un eyaculado pueda ser considerado como de “Calidad Aceptable” y poder ser congelado, debería cumplir con los siguientes requisitos especificados en la siguiente tabla:

Tabla 7: Parámetros de aceptabilidad para congelación seminal (Derivaux, 1976; Bonadonna, 1989; Barth y Oko, 1989; Ax et al., 2000; Dpto. Teriogenología; Elhordoy y Farías, 2003).

Pruebas macroscópicas	Valores de referencia
Volumen	>2 ml
Aspecto	Lechoso a cremoso
Color	Blanco cremoso
Motilidad en masa	> o = 3 (0-5)
Ph	6,5 – 6,9
Cuerpos extraños	Ausentes
Pruebas microscópicas	
Motilidad en masa	> o = 3 (0-5)
Motilidad individual	> 70%
Vigor	> o = 3 (0-5)
Concentración	>o= 750.000.000spz/cm3
Coloración vital	> 70%
Morfología y acrosomía:	
Defectos cabeza	< 15-20%
Defectos acrosoma y cola	< 25%
Anormalidades totales	< 25%

Sanidad del toro donante:

La IA además de mejorar la calidad genética, también busca prevenir o eliminar enfermedades. Existe potencial riesgo de que la IA sea una vía de diseminación de enfermedades infecciosas. Por esto se debe realizar controles por parte de los centros de IA a los toros de forma periódica para tenerlos libres de enfermedades infecciosas. De cualquier manera debería ser de rutina el control de la presencia de patógenos de la reproducción en las muestras de semen mandando muestras al laboratorio. A continuación se presenta una tabla con las enfermedades más comunes y el riesgo de transmisión de éstas a través del semen.

Tabla 8: Nivel de riesgo de transmisión de enfermedades del bovino en IA (Catena y Cabodevila, 1999).

Categoría	Enfermedad	Presencia del agente	Lista de enfermedades de la OIE
1	Enfermedades con evidencia de riesgo alta o moderada		
	Brucelosis bovina	+	B
	Campilobacteriosis genital bovina	+	B
	Diarrea vírica bovina	+	-
	Estomatitis vesicular	+	A
	Fiebre aftosa	+	A
	Haemophilus somnus	+	-
	Mycoplasmosis	+	-
	Rinderpest	+	A
	Rinotraqueítis infecciosa bovina	+	B
	Trichomoniasis	+	B
	Tuberculosis bovina	+	B
	Ubicuitarios (ej. Pseudomona aeruginosa, Escherichia coli)	+	-
	Enfermedades de bajo riesgo de transmisión		
	Lengua azul	+	A
	Leucemia bovina	+	B
	Fiebre efímera bovina	NR	-
Virus Akabane	+	-	
Leptospirosis	+	B	
2	Enfermedades con pequeña o ninguna información de riesgo de transmisión		
	a) Transmisión probable a través de inseminación artificial		
	Inmunodeficiencia bovina	+	B
	Pleuroneumonía contagiosa bovina	+	A
	b) Transmisión improbable a través de inseminación artificial		
	Lumpy skin disease	+	-
	Fiebre del Valle del Rift	NR	A
	Fiebre Q	+	B
	Rabia	NR	-
	Septicemia hemorrágica	NR	B
	Fiebre catarral maligna	NR	B
	Encefalopatía espongiiforme bovina	NR	B
	Listeriosis	+	-
	Anaplasmosis	NR	B
	Babesiosis	NR	B
	Chlamydia	+	-
	Hongos, levadura	+	-
	+: Presencia del agente infeccioso en semen; NR: No reportado		

Dentro de los requisitos zoonosanitarios impuestos por el reglamento del Mercosur para los animales residentes dadores de semen bovino y bubalino, se establece el control, mediante determinadas pruebas estipuladas, de la ausencia de las siguientes enfermedades:

Brucelosis

Tuberculosis

Campilobacteriosis genital bovina

Trichomoniasis

Estas deben presentar resultado negativo cada 180 días.

Los animales residentes cuyo semen será destinado a exportación, serán sometidos a demás a pruebas de diagnostico que deberán presentar resultado negativo a las siguientes enfermedades:

Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR)

Lengua azul

Leucosis bovina enzoótica (Para ampliar información véase Anexo I).

CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación de semen ha sido siempre vista como una forma de beneficiar a la cría de animales de importancia agrícola, y ha sido reconocida como una contribución a la conservación de especies en peligro de extinción y a la superación de los aspectos de la infertilidad masculina en los seres humanos. Sin embargo es generalmente aceptado que hay reducción de la fertilidad como una consecuencia de la crioconservación.

El semen de toro criopreservado se ha utilizado comercialmente en el ganado lechero durante décadas y los resultados de concepción son comparables o mejores que con la monta natural. Sin embargo, este no es así para la mayoría de las especies de mamíferos donde la fecundidad se ve mayormente afectada por la crioconservación. De hecho, las pérdidas por la criopreservación son compensadas por inseminación de un número más grandes de los espermatozoides; esto se da para el semen de ganado así como de otras especies. La diferencia entre las especies se explica por la mayor compensación que se puede lograr en el ganado, en donde son necesarios relativamente pocos espermatozoides para obtener una buena fertilidad. Una completa compensación se puede lograr mediante la inseminación del orden de 20 millones de espermatozoides con capacidad fecundante, y sigue permitiendo la dilución suficiente de semen para hacer el proceso comercialmente viable.

Mientras que otras especies además de necesitar más espermatozoides para lograr la fertilidad, tienen perdidas asociadas a la criopreservación tales que impiden que el proceso sea comercialmente viable. Como generalización, 40-50% de la población no sobreviven, incluso con protocolos optimizados de crioconservación. Cuando se realizan comparaciones sobre el parámetro de motilidad individual progresiva, los resultados siguen siendo generalmente más pobres que con semen fresco, lo que indica que incluso la subpoblación viable después de la criopreservación se ve comprometida. Para superar el problema en algunas especies han sido utilizadas técnicas quirúrgicas que permiten la inseminación de un alto número de espermatozoides en el tracto reproductivo, logrando una fertilidad más satisfactoria, pero a un coste elevado debido a la cirugía (Watson, 2000).

Crioprotectores

Mecanismo de acción

El crioprotector se añade al medio para proteger a los espermatozoides durante la congelación y descongelación (Squires et al., 1999). Estas sustancias son importantes para evitar la formación de hielo intracelular, reducir el estrés osmótico mediante la sustitución de agua necesaria para mantener el volumen celular, interactuar con iones y macromoléculas, reducir punto congelación del agua, y servir de tampón para ajustar los cambios de pH (Medeiros et al., 2002). Los sistemas tampones deben ser uno de los constituyentes de los diluyentes, por el metabolismo del esperma que resulta en la producción de catabolitos tóxicos que provocan el aumento de ácido láctico en el medio extracelular, haciendo que el medio se torne ácido y reduzca la longevidad y la fertilidad de los espermatozoides. El pH óptimo para el esperma está cerca de la neutralidad, por lo tanto la mayoría de los diluyentes está tamponada a pH entre 6,9 y 7,1 (Oliveira, 2003).

El mecanismo de acción de los crioprotectores no está completamente aclarado. Se cree que estos reducen el punto de congelación de la solución, que se determina como temperatura donde se produce la formación de los primeros cristales de hielo. La estructura molecular es un parámetro importante para determinar la eficiencia de los crioprotectores, ya que tienen afinidad por el agua lo que favorece la formación de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua (Baudot et al., 2002). Estas conexiones alteran la orientación de las moléculas de agua de los cristales de hielo, creando un ambiente menos dañino para las células (Dalimata y Graham, 1997). Su acción interfiere con los cambios fisicoquímicos que sufren las células durante el proceso de crioconservación. Aunque la concentración de crioprotector es alta en el medio, su difusión es de 30 a 60 veces más baja que el agua (Graham, 1996). Por lo tanto, estas moléculas atraviesan la membrana, para alcanzar el equilibrio, a tasa más lenta que el agua, lo que provoca la crenación de la célula debido a la rápida salida de agua para diluir la alta concentración fuera; posteriormente el crioprotector penetra y equilibra las concentraciones intra y extracelular. En estas condiciones, el agua vuelve a la célula para alcanzar el equilibrio lo que permite a la célula volver al tamaño normal (Seidel, 1996). Si bien son esenciales para la supervivencia de los espermatozoides en el proceso de congelación, los crioprotectores tienen efectos tóxicos sobre el esperma (Watson, 2000). En alta concentración, los crioprotectores pueden reducir la capacidad fertilizante del gameto, debido a daños por la presión osmótica (Graham, 1996).

Crioprotectores intracelulares

Los crioprotectores intracelulares o permeables a través de sus propiedades coligativas, reducen el grado crioscópico intracelular. Por lo tanto, la mayor cantidad de agua permanecerá en el estado líquido cuando se somete a baja temperatura, disminuyendo la concentración intracelular de solutos y proporcionando así un menor perjuicio para las células espermáticas durante la congelación (Watson, 1995).

Se han usado varios crioprotectores tales como glicerol, sulfóxido de dimetilo, etilenglicol y propilenglicol, y sus combinaciones. Sin embargo, el glicerol se usa con mayor frecuencia, adicionándose a 37 °C o 5 °C, fraccionada o no (Leboeuf et al., 2000). El glicerol se une a la molécula de agua y baja el punto de congelación de las soluciones, por lo que en su presencia se forman menos hielo a cualquier temperatura. De esta manera, se reduce la concentración de solutos en el líquido residual. La influencia dañina de la concentración de solutos depende, aparentemente, de la temperatura. Por lo tanto el glicerol, al reducir la temperatura a la cual se llega a una determinada concentración de solutos, reduce estos efectos dañinos. En soporte de este concepto, el nivel óptimo de glicerol de un diluyente aumenta a medida que la tonicidad del diluyente aumenta. El glicerol probablemente deshidrata las células y forma complejos con los iones metálicos.

El glicerol penetra rápidamente el espermatozoide vivo en suspensión, siendo oxidado por éste, y se concentra en la parte posterior de la cabeza (Cavestany, 1994).

A demás de su efecto osmótico el glicerol parece actuar directamente sobre la membrana plasmática, hay evidencia de que se une a la cabeza de los fosfolípidos, reduce la fluidez de la membrana, y la interacción con las proteínas y enlaces de glicoproteína de membrana (Parks y Graham, 1992).

Para ser más efectivo, el glicerol requiere una tasa de congelación relativamente baja. Aunque el glicerol es esencial para el congelado del semen, también puede afectar adversamente la membrana celular y volver al espermatozoide infértil, aunque la motilidad al descongelado se mantenga (Cavestany, 1994). El efecto tóxico del glicerol ha sido reportado por muchos autores, tales como la desnaturalización de proteínas, alteración en interacciones con la actina en eventos citoplasmáticos debido al aumento de la viscosidad del glicerol intracelular en polimerización de la tubulina en los microtúbulos asociados, actuando directamente sobre la membrana plasmática, y el glicocalix produciendo cambios en las proteínas de superficie celular (Alvarenga et al., 2000b).

Al estudiar el efecto de diferentes crioprotectores (glicerol, etilenglicol, dimetilformamida y sulfóxido de dimetilo) en eyaculados de sementales, Alvarenga et al. (2000b) demostró similar efecto en la adición del etilenglicol y de glicerol, sin embargo informó que cuando se utilizan juntos, permiten la reducción de la concentración de glicerol y por lo tanto se disminuyen los daños causados por su efecto tóxico. Del mismo modo, Alvarenga et al. (2000a) encontraron equivalencia en los resultados del uso de crioprotectores (glicerol, etilenglicol glicol, dimetilformamida y sulfóxido de dimetilo).

El sulfóxido de dimetilo es también ampliamente utilizado como crioprotector. Tanto individualmente como en asociación con glicerol, el dimetilsulfoxido aumenta la motilidad después de la descongelación de las muestras de semen bovino. El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959, el DMSO se ha usado como un crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana (Ávila-Portillo et al., 2006).

Crioprotectores extracelulares

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes, y los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (ellos no obedecen la ley de Raoult).

Algunas sustancias, tales como lípidos, proteínas y macromoléculas, son eficaces en la protección de la célula espermática durante el proceso de congelación, sin la necesidad de que penetren en su interior. Estas sustancias se pueden encontrar en la yema de huevo, leche, en algunos azúcares y albúmina sérica bovina. Yema huevo contiene lecitina (fosfatidilcolina), que parece proteger la membrana mediante la restauración de fosfolípidos celulares perdidos por espermatozoides durante el

choque térmico (Watson, 1995). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se adhieren a la membrana celular durante el proceso de crioconservación, preservando la membrana de los espermatozoides (Moussa et al., 2002). Los fosfolípidos que componen la fracción LDL de la yema de huevo protege a los espermatozoides durante la refrigeración (5°C). Por lo tanto, el uso de fosfatidilserina purificada ha demostrado proteger el esperma de los toros contra el choque térmico (Wilhelm et al., 1996). Los liposomas que comprenden fosfatidilserina y colesterol protegen el esperma de toros, y los daños causados por el proceso de congelación, posiblemente mediante la prevención de los cambios deletéreos durante la crioconservación. La prevención conferida por daño a los lípidos por choque térmico parece estar relacionada a la quelación ion de Ca del medio, impidiendo su entrada en el espermatozoide. (Wilhelm et al. 1996). Los azúcares actúan por la presión osmótica al deshidratar la célula, reduciendo el agua que puede estar congelada en la célula a fin de reducir la lesión causada por la cristalización del hielo (Aisen et al., 2002). Más allá de actuar como crioprotectores, el azúcar actúa como un sustrato para la energía de los espermatozoides durante la incubación (Yildiz et al., 2000), lo que confiere protección a la membrana plasmática durante la congelación y descongelación a través de la interacción directa con la membrana, la cual implican enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo de azúcares con grupos fosfato situado en la cabeza de fosfolípidos.

Por la restauración porcentual de agua en torno al grupo de las cabezas de los fosfolípidos, los azúcares pueden prevenir el daño causado por la deshidratación que puede ocurrir en la congelación.

Generalmente disacáridos (sacarosa y trehalosa) son más eficaces en la estabilización de la bicapa de la membrana que los monosacáridos (De Leeuw et al., 1993), manteniendo al mismo tiempo su capacidad de transportar calcio, inhibiendo la fusión de la membrana y manteniendo los lípidos en una fase de fluido ante la ausencia de agua (Anchordoguy et al., 1987; Crowe et al., 1987).

Principios de Preservación de Semen

El estado de la membrana plasmática de los espermatozoides es de suma importancia debido a su función, no sólo como límite de la célula, sino también para las interacciones célula a célula, por ejemplo entre el espermatozoide y el epitelio del tracto genital femenino y entre el espermatozoide y el ovocito. La relación entre el grado de daño de los espermatozoides después de la descongelación y la fertilidad no siempre es clara (Januskauskas et al., 1996; Garner et al., 1997), pero tiende a aumentar cuando el daño es extenso (Januskauskas et al., 2001).

La reducción de la fertilidad asociada a la inseminación artificial (IA) con semen criopreservado, ha sido atribuidas a los procesos que se producen durante la congelación de semen, donde aproximadamente 10 a 50% de los espermatozoides de un eyaculado no resistir este proceso y mueren (Watson, 2000). Los procedimientos de congelación y descongelación causan daño celular debido al cambio de temperatura, la formación de cristales de hielo, las injurias oxidativas en la membrana del espermatozoide, daños del ADN, estrés osmótico, además de la toxicidad de los crioprotectores (Ball y Vo, 2001c). El espermatozoide parece

sensible al estrés osmótico y a la adición y eliminación de crioprotectores (Watson, 2000; Ball y Vo, 2001c). El enfriamiento, cuando se realiza de manera incorrecta, provoca un choque térmico que induce la aparición de daños parcialmente irreversible, lo cual es caracterizado por un patrón anormal de movimiento de esperma (movimiento circular o retrógrado) con rápida pérdida de la motilidad, lesiones del acrosoma, daño a la membrana plasmática, disminución de la actividad metabólica y pérdida de componentes intracelulares. Muchas de estas lesiones son causadas por cambios de membrana, que se dan mientras que los espermatozoides avanzan en el cambio de fase y durante el proceso de enfriamiento (Graham, 1996).

Eventos físicos de la criopreservación

Durante el proceso de criopreservación, el semen debe ser refrigerado, sin causar daño a los espermatozoides. Para esto es necesario diluir el semen en el medio adecuado.

La tensión inicial se produce cuando el esperma es sometido a la temperatura de refrigeración a 5 °C (Squires et al., 1999). El desafío celular durante la congelación y descongelación está dado por la capacidad de la célula de soportar temperaturas mucho más bajas, sobre todo al pasar una fase crítica del proceso (-15 a -60 ° C). Las células normalmente resisten la reducción de la temperatura, sin embargo no soportan la formación de cristales de hielo que determina deshidratación, dando lugar a un desequilibrio osmótico con consecuente deshidratación celular (Holt, 2000). La formación de cristales de hielo se forma en el espacio extracelular generando un gradiente osmótico entre la solución intracelular inicialmente isotónica y una solución congelada extracelular que se encuentra concentrada. Dependiendo de la velocidad de refrigeración el agua se mueve a través de la membrana y se une a la fase congelada del medio extracelular o se congela formando hielo dentro de la célula. En la mayoría de los casos, las células sometidas a la formación de cristales de hielo intracelular se tornan osmóticamente inactivas o son lisadas debido a la pérdida de integridad de la membrana (Denvireddy et al., 2002). La célula espermática es también sensible a los efectos tóxicos de los crioprotectores, porque se tornan inviables por el uso de determinados componentes comúnmente utilizados para otras células (Watson, 2000).

Durante el proceso de crioconservación la suspensión de espermatozoides llega a temperaturas por debajo del punto de congelación del medio (súper enfriamiento), antes de que haya una formación de cristales. Cuando los cristales de hielo empiezan a formarse, ocurre un incremento de la temperatura necesaria para la cristalización, lo que puede ser perjudicial para los espermatozoides, siendo minimizado mediante el uso de curvas apropiadas de congelación (Squires, 1999). Cuando el proceso de congelación es muy lento ocurre la congelación de agua extracelular con consecuente concentración del soluto, colocando a la célula momentáneamente en un medio hipertónico, y determinando la pérdida rápida de agua, lo que conduce a la deshidratación celular y al aumento de la concentración de soluto extracelular. Por otra parte, cuando la célula es congelada rápidamente, no hay pérdida de agua, promoviendo por lo tanto, la formación de cristales de hielo intracelulares (Mazur, 1985).

Debajo de la temperatura de 5 ° C, el agua intra y extracelular permanecen súper enfriadas y no cristalizadas. Sin embargo, temperaturas de entre -5 y -10°C, se empiezan a formar cristales de hielo en el medio extracelular que permanece súper enfriado, ocurriendo intercambio de agua para mantener el equilibrio entre el medio intra y extracelular, dando lugar a deshidratación celular. En este momento, la curva de congelación debe ser lenta para evitar la congelación del agua intracelular, y lo suficientemente rápida para evitar el contacto de la célula deshidratada con el medio hiperosmótico. La deshidratación severa promueve la desnaturalización de las macromoléculas y un encogimiento excesivo de las células determinando un colapso de la membrana celular (Medeiros, 2002). La pérdida de agua y la deshidratación celular son eventos deseables debido a que reducen la posibilidad de formar grandes cristales de hielo dentro de la célula, lo que podría causar daños a estructuras interna y/o a la membrana plasmática (Squires, 1999).

El proceso de descongelación depende de cómo el semen se congeló. Los espermatozoides congelados en curvas moderadas exigen curvas adecuadas para descongelarse. En este caso, como el hielo extracelular descongela lentamente, diluye lentamente el soluto de las fracciones de agua sin congelar, lo que permite que el agua difunda lentamente hacia adentro de la célula, diluyendo el soluto intracelular hasta llegar a la concentración inicial. Si los espermatozoides se descongelan rápidamente, el hielo se derrite rápidamente diluyendo el soluto y el agua se introducirá rápidamente al espermatozoide, con lo cual se encontrara altamente concentrado y dañado (Graham, 1996).

Es esencial que la muestra de semen sea diluida adecuadamente de forma que contenga cantidad suficiente del diluyente para acomodar las células espermáticas en una pajuela de inseminación, de modo que una tasa de fertilidad mayor pueda ser alcanzada logrando un número menor de espermatozoides por inseminación y de inseminaciones. Sin embargo, esto debe ser correctamente medido con base en el conocimiento de la concentración de espermatozoides (Evans y Maxwell, 1987; Ritar et al., 1990). Según Chemineau et al. (1991), el tamaño de la pajuela debe determinar la altura sobre el nitrógeno líquido. Fue sugerido que para pajuelas de 0,5ml deben ser refrigeradas a 4 cm del nivel de nitrógeno líquido durante 5 min. y luego sumergido en nitrógeno líquido, mientras que las pajuelas de 0,25ml debe ser colocadas a 16 cm por encima del nitrógeno líquido durante 2 min., luego bajarlas a 4 cm por 3 min. Para posteriormente sumergir en nitrógeno líquido y almacenamiento. Los congeladores programables son convenientes para la congelación de grandes cantidades de pajuelas de semen, a demás de controlar la tasa de congelación. El beneficio de muchos congeladores programables es que la curva de refrigeración puede ser programada, por ejemplo, de 4 a -5°C durante 4 min., de -5 a -110 °C durante 25 min. y -110 a -140 ° C durante 35 min. y, sólo entonces, las pajuelas de semen se sumergen en nitrógeno líquido (Purdy, 2006).

Almacenamiento de Semen

El almacenamiento a largo plazo facilita el transporte del semen a través de grandes distancias, permite la cuarentena de semen, y permite ampliar el uso de genética superior, incluso después de muerto. Para los animales de importancia agrícola, la criopreservación de semen es una industria mundialmente establecida, en particular

para el ganado lechero. También es un recurso para preservar la biodiversidad de especies en peligro de extinción, o líneas transgénicas de valor, también se benefician de la criopreservación de espermatozoides (Bailey et al., 2000).

El almacenamiento de esperma, en particular en estado congelado, causa daño ultraestructural, bioquímico y funcional de los espermatozoides, con una reducción de la motilidad, viabilidad, transporte y problemas de fertilidad. Muchas investigaciones se han dedicado a estos problemas, pero la fertilidad del semen almacenado es generalmente menor que la de semen fresco (Leboeuf et al., 2000). El hecho de que la concentración de oxígeno en fluidos o células del sistema reproductor femenino se reduzca en el momento de la ovulación, indica la relevancia fisiológica del oxígeno y sus metabolitos en las funciones espermáticas (De Lamirande et al., 1997). Así, las bajas concentraciones de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) son necesarias para adquirir capacidad fecundante de espermatozoides (Baumber et al., 2003). Sin embargo, la generación de altas concentraciones de ROS en el semen pueden afectar el metabolismo energético, la motilidad, viabilidad e integridad de ADN de esperma de varias especies (Bilodeau et al., 2002).

En la actualidad, el conocimiento limitado de la acción de los oxidantes y antioxidantes que se encuentran en el semen de animales domésticos puede ser responsable de ineficiencia en los resultados obtenidos siguiendo los procedimientos de crioconservación en algunas especies y posterior uso en las técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial o la fecundación in vitro.

Se sabe, sin embargo, que una variedad de mecanismos de defensa llamados antioxidantes, están involucrados a sistemas biológicos, y en el equilibrio entre los beneficios y los riesgos de los ROS in vivo e in vitro. Los antioxidantes parecen ser necesarios para la operación reproductiva normal. Así, estudios que implican análisis del estrés oxidativo originado durante la ejecución de algunos procedimientos de laboratorio pueden contribuir a una posible intervención terapéutica con antioxidantes que ayuden en la optimización de las biotecnologías reproductivas (Guerra et al., 2004). Por lo tanto, el desarrollo de protocolos para la congelación deben considerar la cuantificación de ROS generados, y también la identificación de sustancias que pueden actuar sobre la protección de células espermáticas de los efectos oxidativos ocurridos en la criopreservación de semen (Valencia y Guerra, 2007). Además, la generación de ROS por espermatozoides dañados tienen un importante impacto sobre las células viables restantes, ya que representan un daño acumulativo para los espermatozoides almacenados (Ball et al., 2001b). Existe un estrés asociado a la congelación causado por los cambios de temperatura a que los espermatozoides son sometidos durante el proceso de enfriamiento, los efectos de los componentes del medio y los mismos crioprotectores durante el proceso y, finalmente, por los efectos de la descongelación (Vishwanath y Shannon, 2000). El daño oxidativo a los espermatozoides durante el almacenamiento es una causa potencial de la disminución de la motilidad y la fertilidad durante el almacenamiento hipotérmico de semen líquido.

Particularmente el almacenamiento de semen, en estado congelado, causa cambios bioquímicos y funcionales en los espermatozoides, resultando en una reducción de la movilidad y la viabilidad, con el obvio perjuicio posterior durante el transporte y la fertilidad (Leboeuf et al., 2000). La fertilidad se ve reducida debido a que los espermatozoides dañados o defectuosos generan grandes cantidades de especies

reactivas de oxígeno y éstas son responsables del daño oxidativo (Ball et al., 2001a).

Acción de ROS en células espermáticas

Los ROS actúan directamente sobre la fertilidad del macho, ya que son los responsables de procesos como la hiperactivación, capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides, así como la fecundación.

Durante el paso por la cola del epidídimo, los espermatozoides se encuentran en estado inmóvil, caracterizados por la baja concentración intracelular de AMPc y calcio, así como suprimida su capacidad de producir ROS (White y Aitken, 1989). Esta condición es revertida durante las primeras etapas de capacitación, en donde se constata un aumento en la concentración de calcio intracelular y AMPc, teniendo inicio la producción de ROS, en consecuencia, los espermatozoides desarrollan gran motilidad conocido como hiperexcitación. Por otra parte, el ROS también puede causar graves daños a espermatozoides cuando sus mecanismos de defensa están limitados. Las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero el desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide (Ball et al., 2002).

Como se mencionó, la pobre supervivencia espermática es uno de los principales problemas, por lo que el conocimiento de las características biofísicas de la membrana plasmática espermática es fundamental para proponer una solución (Holt, 2000).

Peroxidación Lipídica

La dinámica de la membrana plasmática del espermatozoide cumple un papel importante en los procesos de maduración, capacitación y fecundación (Wolfe et al., 1998; Müller et al., 1999); sin embargo, el aumento de las ROS puede dañarla (Clarkson y Thompson, 2000) y una de las principales causas del deterioro espermático es el estrés oxidante que causa peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, modifica su fluidez y altera la permeabilidad, lo que puede conducir a la célula a un proceso de muerte celular (Batellier et al., 2001).

La peroxidación lipídica (LPO) parece ser una causa particularmente importante para la disfunción de esperma. Los lípidos de la membrana espermática son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que en alta concentración, determina la fluidez de membrana que permite participar en los eventos de fusión de membrana espermática durante la fertilización. Así, los espermatozoides con LPO presentan reducción de la fluidez de membrana y su capacidad de fertilización (Aitken, 1995). Bajo condiciones oxidativas extremas, todos los componentes celulares (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares) son potencialmente afectados por el estrés oxidativo, cuya extensión de los daños depende no sólo de la naturaleza y cantidad de ROS, sino también del tiempo y la duración de la exposición, asociados a factores extracelulares como temperatura y ambiente que pueden resultar en la muerte celular (Sharma et al., 1999).

Durante el proceso de crioconservación, la célula espermática sufre lesiones del acrosoma que disminuyen su viabilidad debido a la manipulación, exposición al oxígeno y muchos otros procedimientos que pueden aumentar la producción de ROS. Los sistemas de defensa antioxidantes de los espermatozoides es el plasma seminal que juega un role importante para la viabilidad espermática. Sin embargo, en condiciones naturales de apareamiento, el espermatozoide es expuesto, principalmente a condiciones anaeróbicas, reduciendo los potenciales daños causados por ROS. Sin embargo, cuando son manipulados para su uso en IA, el semen se expone al oxígeno, así como diversos procedimientos de laboratorio. Durante el procesamiento pueden aumentar la producción de ROS, así como la reducción de las defensas antioxidantes. El lavado de muestras de semen, por ejemplo, retira una protección antioxidante proporcionada por el plasma seminal. Todos estos factores pueden contribuir para aumentar la ocurrencia de daños oxidativos en los espermatozoides observados en el semen manipulado (Maia, 2003).

Según Aitken (1995), la capacidad de biosíntesis del espermatozoide es limitado, lo que hace difícil para éste, sustituir cualquier molécula que haya sido dañada. Además, las enzimas antioxidantes pueden estar concentradas en la pieza intermedia, dejando menos protegida gran parte de la membrana que cubre la cabeza y cola espermática. Por lo tanto, el plasma seminal es particularmente importante en la protección de los espermatozoides contra el daño causado por ROS generados por los fagocitos y por los espermatozoides presentes en el eyaculado.

Adición de antioxidantes a diluyentes

Las propiedades antioxidantes de los diluyentes utilizados rutinariamente para la criopreservación de semen son pocos conocidos, y los efectos del exceso de producción de ROS en esos diluyentes tampoco están bien caracterizados. Sin embargo ese conocimiento es fundamental para que se pueda entender como la motilidad espermática es afectada cuando se utiliza determinado diluyente después de la aparición de estrés oxidativo resultante de la crioconservación, ayudando en la formulación de diluyentes de acuerdo con sus propiedades antioxidantes. Con el objetivo de reducir el daño oxidativo causado por la alta concentración de ROS, están siendo realizados algunos estudios como la utilización de sustancias antioxidantes en muestras de semen de pequeños rumiantes (Maxwell y Stojanov, 1996; Sinha et al., 1996).

Para combatir el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, los espermatozoides constan de un sistema antioxidante que consiste en glutatión reductasa (GSH) glutatión peroxidasa (GSH-Px), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ácido ascórbico y tocoferol (Aitken, 1995). Extracelularmente los espermatozoides son protegidos por plasma seminal, que contienen diversos reductores de ROS (enzimática y no enzimática), tales como ácido ascórbico, ácido úrico, albúmina y otras proteínas, catalasa, SOD, glutatión y otros tioles, taurina, hipotaurina y vitamina E (Zini et al., 2000).

La elaboración de protocolos de congelación debe considerar la cuantificación de ROS generado y la identificación de sustancias que pueden actuar sobre la protección de las células de espermatozoide de los efectos oxidativos ocurridos en el semen criopreservado (Valencia y Guerra 2007).

La vitamina E (tocoferol y sus derivados), predominante antioxidante soluble en grasa, protege a las células de radicales de oxígeno in vivo e in vitro, y se cree que es el inhibidor principal de ROS, que se encuentran en pequeñas cantidades en las membranas celulares de mamíferos y en el plasma seminal (Sikka, 2004), protegiendo las células del estrés oxidativo (Kagan et al., 1992).

La vitamina C también actúa sinérgicamente con la vitamina E, a través de la generación de tocoferol a partir de radicales de tocoferoxil, producto de la interacción de tocoferol y ROS (Buettner, 1993).

Sin embargo, es de destacar que los efectos de la vitamina E pueden variar con la dosis utilizada, ya que, según la cantidad de radicales de hidroxilo a ser inactivados, la vitamina E puede tener efectos antioxidantes o estimular la oxidación (Cao y Cutler, 1997, citado por Valencia y Guerra, 2007).

Sánchez et al., (1997), evaluaron el efecto de los compuestos de epidídimo (taurina e hipotaurina inositol) y antioxidantes (carnosina y ácido ascórbico), en la motilidad y la fertilidad de los espermatozoides. Observaron que sólo la taurina ejerció un efecto positivo sobre la motilidad del espermatozoide, tanto en presencia como en ausencia de glicerol. Sin embargo, a pesar de la mejora en la motilidad del espermatozoide, la fertilidad del semen congelado en presencia de taurina (50 mM) no difirió de la observada en el semen congelado sin taurina. Esto indica que otros factores además de la motilidad están relacionados a la capacidad fertilizante de los espermatozoides criopreservados. No hay consenso en la literatura sobre el efecto preventivo de las sustancias antioxidantes agregadas al diluyente. Mientras que algunos estudios han reportado efectos positivos de la adición de estas sustancias, otros no han observado ningún beneficio. La divergencia en los resultados observados dentro de la misma especie sin duda se debe a las variaciones en edad y raza de los animales utilizados, en la composición de diluyente, en la forma de conservación de dosis de semen y en las combinaciones de antioxidantes, entre otros.

CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN

Fundamentos de la congelación

La congelación de semen presenta varios problemas, incluyendo el shock de frío, el daño por la fracción de cristales de hielo, y los cambios intracelulares provocados por la deshidratación asociada a la formación de cristales de agua. El congelado es esencialmente un proceso de desecación.

Cuando una suspensión de espermatozoides es enfriada por debajo de 0°C, el primer paso es la formación de cristales de hielo extracelular; la concentración de solutos en el agua extracelular aumenta. Inicialmente, el agua intracelular no se congela, pero es “superenfriada” por debajo del punto de congelación.

Debido al aumento de concentraciones de solutos extracelulares, el agua pasa de la célula al espacio extracelular. A medida que el agua sale de la célula para congelarse, la célula se deshidrata. Si el agua no puede abandonar la célula lo suficientemente rápido, se forman cristales de hielo intracelulares. Estos cristales dañan al espermatozoide, mientras que los cristales extracelulares no causan daño irreversible. Si el proceso de enfriado es muy lento, la concentración de solutos intracelulares, deshidratación, precipitación de solutos y cambio de pH., pueden

ocasionar daños. La tasa (velocidad) óptima de congelado es un compromiso entre estos dos puntos (Cavestany, 1994).

El agua pura se congela y forma cristales a 0°C, mientras que el agua que contiene iones y otras sustancias en solución lo hace a temperaturas más bajas, dependiendo de la concentración de tales sustancias. Conforme el agua de una solución se congela, los cristales de agua pura que se forman van dejando en pos mayores concentraciones líquidas de aquellas sustancias que están en solución. Este hecho aumenta la presión osmótica del resto del soluto, lo que puede determinar la lesión de las células.

Los espermatozoides pueden actualmente conservarse en nitrógeno líquido, a temperaturas tan bajas como -196°C y sobrevivir con fertilidad relativamente alta después de descongelados. Sin embargo muchos de los espermatozoides existentes mueren o se convierten en inmóviles por la congelación y descongelación. De aquí que, para una óptima fertilidad, se utilice un número mayor de espermatozoides congelados que para las técnicas de semen no congelado. La fertilidad del semen congelado depende principalmente del cuidado ejercido en la dilución inicial del semen antes de la congelación, y tras la conservación, la fertilidad depende del cuidado y método de calentar el semen diluido antes de la inseminación.

Consecuencias físicas y químicas:

Un 50% al menos de los espermatozoides mueren o se hacen inmóviles durante la congelación y descongelación. La lesión está causada por 1) la formación de cristales de hielo internos que afectan a la estructura del espermatozoide, 2) por la concentración del soluto que se produce conforme el agua pura se quita del medio de suspensión del interior y del exterior de las células, y 3) por las interacciones de esos dos factores físicos.

Las principales consecuencias físicas y químicas de la congelación son la separación del agua pura de la solución para formar hielo y la mayor concentración de solutos resultante en el líquido residual. Estos hechos y sus efectos sobre las células de hallan influidos por el nivel, los tipos de agentes crioprotectores, la osmolaridad, el pH del diluyente y por la rapidez de congelación. Las mayores concentraciones de soluto que se forman conforme el agua se congela, parecen ser la causa principal de la lesión celular (Salisbury et al., 1978).

El punto de congelación de una solución está dado por la concentración de partículas que contiene como solutos. Cuando la solución se enfría, pasado el punto en el cual se forman cristales de hielo, tiene lugar una continua serie de eventos.

La tasa de enfriado depende de la diferencia de temperatura entre la solución y su líquido refrigerante, su masa relativa. Dependiendo de la concentración de solutos y la tasa de enfriamiento, la temperatura de la solución cae por debajo del verdadero punto de congelación del agua hasta que se forma un cristal de hielo alrededor de la célula. A ese punto, el calor de fusión requerido para formar hielo debe ser removido de la solución de modo que la temperatura sufre elevación. Mientras que cada molécula de agua pura de la solución se congela, la concentración de partículas en la que permanece aumenta, resultando en una constante caída del punto de congelación de la solución. Estos cambios interrelacionados continúan hasta que

todo el solvente, con sus solutos y otros compuestos, hayan completado el proceso a través del “punto eutéctico” (mezcla de cuerpos sólidos cuya fusión se realiza a una temperatura constante como la de los cuerpos puros).

Debido a una larga exposición de las células, los efectos dañinos de la alta concentración de solutos son más críticos con bajas tasas de congelación. Similarmente, debido a que las células deben ser expuestas a concentraciones de solutos dañinas durante el descongelado, éste debe ser rápido.

La formación de cristales extracelulares no es una causa primaria de daño espermático durante la congelación. La formación de cristales intracelulares, sin embargo, es letal.

El aumento de concentración de solutos, ocasionado cuando el agua se congela, parece ser la principal causa de daño celular. La concentración de solutos, la velocidad de cambio, y los efectos dañinos en el espermatozoide dependen de la temperatura y su tasa de cambio. Durante el congelado lento, las células están expuestas por períodos prolongados a concentraciones de solutos que están aumentando relativamente despacio, y puede ocurrir deshidratación celular.

Durante un congelado rápido, la duración de la exposición a una aumentada concentración de congelación de solutos se reduce, y la deshidratación celular se puede evitar.

El aumento de presión osmótica del medio de suspensión que acompaña el congelamiento, saca agua de dentro de la célula, aumentando la concentración intracelular de electrolitos. En contraste, el congelamiento rápido, como el obtenido por inmersión directa en nitrógeno líquido, resulta en la formación de un número relativamente grandes de pequeños cristales, tanto dentro del espermatozoide como en el medio de suspensión. El hielo intracelular se puede formar durante el congelamiento rápido porque hay un tiempo suficiente para que toda el agua congelable difunda de la célula. Tanto el congelamiento rápido como el lento causan daño celular, aunque por diferentes mecanismos (Cavestany, 1994).

Proceso de congelación

Diluyentes:

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).

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

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). 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) (Cavestany, 1994).

Dada la gran variedad de diluyentes existentes, cada laboratorio (o cada profesional especializado) debe determinar que diluyente, bajo sus condiciones, provee un máximo de eficiencia reproductiva (Cavestany, 1994).

Componentes básicos de los diluyentes para congelación:

1) Agua, que se comporta como solvente de los componentes seminales y del diluyente; 2) sustancias disueltas iónicas y no iónicas, para mantener la osmolaridad y tamponar el pH del medio (generalmente citrato de sodio, Tris amino metano o glutamato monosódico); 3) sustancias orgánicas con capacidad de impedir el choque de frío (por lo general yema de huevo o leche); 4) agentes crioprotectores, como glicerina o DMSO (dimetil sulfóxido); 5) azúcares simples como fuente de energía o di- y tri-sacáridos como crioprotectores adicionados; 6) aditivos tales como enzimas que puedan mejorar la fertilidad; 7) antibióticos para el controlar el crecimiento microbiano.

La ventaja del diluyente Yema - Tris sobre el Citrato - Yema común es que se puede trabajar a temperatura ambiente, y se puede agregar el glicerol al comienzo, sin dañar el espermatozoide. Permite hacer la dilución y envasado a temperatura ambiente y el enfriado y equilibrado posteriormente. Es práctico cuando no se cuenta con cámara de frío o vitrina refrigeradora para trabajar. La desventaja es el costo más elevado, sobretodo del TRIS.

Hoy en día las compañías de IA a nivel mundial preparan su propio diluyente adaptados a sus requerimientos. En los últimos años ha habido una fuerte movida

para eliminar la yema de huevo del sistema ya que al ser un material biológico se lo ha percibido como un riesgo para la salud. Sin embargo las alternativas no han sido tan exitosas como la leche o la yema de huevo.

Algunos de los nuevos diluyentes presentan doble propósito, sirviendo tanto para utilizar de forma líquida como para congelar semen. Los más comúnmente citados en la literatura son los siguientes:

- Biladyl: suministrada por Minitub Germany y se usa para semen congelado. Consiste en dos fracciones que se diluyen en el semen por etapas, con adición de yema de huevo, agua y ATB.
- Triladyl: suministrada por Minitub Germany y se usa para semen congelado. Este es similar al Biladyl pero es un medio de dilución de un solo paso.
- Biociphos: suministrada por IMV, Laigle. France. Medio de dilución de un solo paso, contiene extracto de soya en sustitución de la yema de huevo.
- Laciphos: suministrada por IMV. Este medio es de leche descremada en polvo, por lo que necesita la adición de agua. Tanto éste como el anterior se les adiciona ATB.
- Tris concentrate: Gibco, Holland Genetics. Este es el común medio a base de Tris pero 5 veces más concentrado. Es el diluyente más común para congelación de semen. El diluyente Tris también ha sido usado como diluyente líquido.
- Caprogen concentrado: Creado para almacenamiento a temperatura ambiente (18 a 24°C). Suministrado por Livestock Improvement, New Zealand. Permite el almacenamiento de semen líquido hasta por 4 días sin afectar su fertilidad (Vishwanath y Shannon, 2000).
- Andromed: suministrada por Minitub Germany. Para congelación de semen bovino, también apto para preservación de semen fresco.

Cálculo de Dilución

Relación de la dilución inicial: El eyaculado normal de la mayoría de los animales domésticos contiene mayor cantidad de espermatozoides de los necesarios para que se produzca la concepción. Por lo tanto es una práctica corriente diluir parcialmente el semen inmediatamente después de su recogida hasta un número constante de espermatozoides o hasta un volumen estándar para su enfriamiento a 4-5°C. Posteriormente se llenan las pajuelas con el semen diluido y se sellan (Pickett y Berndtson, 1978; Parkinson, 2001).

1. Determinación de la Concentración

Se realizan las pruebas para cálculo de concentración.

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

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 cm^3 .
- 2.- volumen: 5 cm^3 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:

$$200 * 0.5 = 100 \text{ cm}^3 \text{ de semen diluido}$$
$$100 - 5 = 95 \text{ cm}^3 \text{ de diluyente.}$$

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) (Cavestany, 1994).

Enfriado:

Durante la colección o la dilución inicial, el semen debe mantenerse a $35-37^\circ\text{C}$. El diluyente también debe mantenerse a la misma temperatura (hay quienes aconsejan bajar la temperatura del semen y diluyente a $27-30^\circ\text{C}$).

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).

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

Glicerolización (adición de glicerol):

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.

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

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).

Equilibración:

El intervalo entre se denomina equilibración.

Clásicamente, el semen de toro diluido es enfriado a 5 °C, se le agrega glicerol y luego se deja un intervalo de 1-10 horas para “equilibración”, osea que es el intervalo entre la adición de la fracción de diluyente con glicerol y el congelado. En un comienzo se pensó que esta etapa era necesaria para permitir la entrada de glicerol a la célula, y completar así su acción protectora. En la actualidad se puede comprobar que el glicerol penetra rápidamente la célula, y que este intervalo se debe más a un acostumbamiento de la célula a temperaturas bajas previo al congelado.

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.

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

Envasado en Pajuelas (Paillettes):

Existen básicamente tres tipos de pajuelas:

-La pajuela francesa, de 113mm de largo y un volumen de 0,5 cm³ (es la más común).

-La “mini pajuela”, de igual largo que la anterior pero de 0,25 cm³ de volumen.

-El “minitub”, de origen alemán, es una pajuela de aproximadamente la mitad largo que las anteriores y un volumen de 0,25 cm³.

Las pajuelas tienen un tapón de algodón y alcohol polivinílico en una punta. Luego del llenado, el otro extremo se sella con ultrasonido (si se usa la envasadora automática de Cassou) o sumergiendo el extremo de la pajuela en alcohol polivinílico (esta droga viene en polvo, y al contacto con el líquido se humedece, sellando la pajuela).

Congelación:

Después de enfriar el semen diluido a 4-5 ° C y posterior equilibración, se realiza la congelación de las pajuelas. Estas se suspenden horizontalmente en vapor de nitrógeno líquido (NL) a 4-5 cm por encima del NL durante 4-5 min, luego al llegar a los – 100° C, las pajuelas son sumergidas en el nitrógeno.

La velocidad de enfriamiento puede ser regulada por la distancia de las pajuelas desde el nivel de NL y el tamaño de la pajuela (0,25 o 0,50 cm³) (Leboeuf et al., 2000).

Proceso de descongelado:

Es difícil, sino imposible, separar los efectos del congelado de los del descongelado. Teóricamente, cuanto más rápido es el congelado, más rápido debe ser el descongelado. Sin embargo, el descongelado puede estar influenciado por otros eventos. 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 (agua, aire, etc.), temperatura y método de descongelación.

No hay una receta específica en cuanto a la mejor técnica de descongelado, sino que el técnico debe seleccionar el método más conveniente a lo expresado en el párrafo anterior, y a las condiciones particulares de cada trabajo. En términos generales, la principal norma a tener en cuenta es que el semen, desde el momento en que es retirado del termo de inseminación, no debe ser sometido a oscilación de temperatura.

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

1) Descongelado al aire a temperatura ambiente.

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

2) 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.

3) Descongelado a 75° C por 12 segundos.

4) Descongelado en agua a 37° C (Cavestany, 1994).

EVALUACIÓN POST DESCONGELADO

Debido a la relación entre la calidad del material genético y la fertilidad seminal, se realiza a menudo la determinación de la calidad del semen para ser utilizado en IA (Bicudo et al., 2007). Normalmente los laboratorios con el objetivo de estimar el potencial de fertilidad de una muestra de semen realizan determinadas pruebas: Motilidad espermática (%), vigor (0-5), concentración espermática (millones/ml), morfología (%) y prueba de termorresistencia (lenta o rápida) (Arruda et al., 1992).

Lo que se busca es evaluar si el semen fue capaz de superar el proceso de congelación y de descongelación. Se evalúan factores intrínsecos (semen) y extrínsecos (manejo de N₂ líquido en termo, etc.).

La evaluación post descongelación consiste en descongelar dos pajuelas de 0,5 ml o 0,25 ml en baño de agua a 36°C. A los 45 segundos se extrae una de las pajuelas y se seca con toalla de papel, debido a que el agua puede ser nociva para los espermatozoides. El contenido de la pajuela se agita hacia el extremo con tapón de algodón, en tanto que el extremo opuesto de la pajuela se corta, para liberar el semen en un tubo de ensayo pequeño, limpio y desechable, cortando la abertura pequeña que se encuentra justamente por debajo del tapón de algodón. Se coloca una gota pequeña del semen sobre el portaobjetos tibio con cubreobjetos (Hafez, 2000).

Según Barth y Oko (1989) para evaluar semen congelado se deben tener en cuenta al menos 3 parámetros básicos:

- Viabilidad post-descongelación (% de motilidad progresiva, vigor y acrosomía)
- Morfología
- Concentración de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante

Estas tres pruebas si bien deben hacerse inmediatamente post-descongelación, debido a que el daño de membrana puede no ser completamente expresado en este momento, se deberían hacer la evaluación conocida como prueba de termorresistencia o de incubación, donde el semen se incuba a 37°C durante 2 horas.

Pruebas microscópicas:

Motilidad individual (valores aceptables):

0hs valor mín. 40% de spz móviles (según ISO 9002 25%)

2hs valor mín. 30% de spz móviles (según ISO 9002 15%)

Vigor (valores aceptables):

0hr valor mín. 3

2hs valor mín. 2

Acrosomía (valores aceptables):

0hr valor mín. 60% acrosomas intactos
2hs valor mín. 40% acrosomas intactos

Morfología (valores aceptables):

Los valores se mantienen igual que para semen fresco.

Se estima como valor mínimo aceptable 75% de acrosomas normales y también 75% de espermatozoides normales (sin malformaciones). Pero este máximo de 25% de malformaciones espermáticas permitido, debe contemplar un límite máximo de defectos del núcleo (cabeza) del espermatozoide que se encuentre en el rango de 15-20%, mientras que defectos del acrosoma y la cola se pueden tolerar hasta en un 25%. (Saacke, 1970; Catena y Cabodevila, 1999; Tribulo et al., 2002).

Concentración (valores aceptables):

Al descongelar valor mínimo 10×10^6 spz móviles /pajuela. Una vez hallada la concentración de espermatozoides/mm³ se multiplica por el % de spz móviles (ya hallados) obteniéndose el número de spz móviles por dosis.

Test de Termorresistencia

Existen varias pruebas a las que puede ser sometido el semen luego del descongelado para ser considerado apto, desde las más simples como la estimación del porcentaje de motilidad, hasta más complejas que incluyen tinción y observación de acrosomas.

La prueba de termorresistencia (o incubación) es la más comúnmente utilizada para determinar la vitalidad del semen luego de descongelado.

Fue creada por Dimitropoulos en 1967 para la evaluación de la fertilidad potencial de partidas de semen congelado de bovino.

La prueba consiste en la incubación de una muestra de semen a 38°C durante 5 horas, luego se verifica el porcentaje de motilidad espermática progresiva, presentando una correlación positiva altamente significativa con la fertilidad real, medida como el tasa de no retorno a los 60-90 días. El mismo autor procuro obtener mayor rapidez en la evaluación del poder fecundante del semen congelado, estudiando una nueva prueba complementaria, denominada test de termorresistencia rápida, colocando la muestra a baño maría a 46°C, durante media hora.

La pruebas de termorresistencia adquirieron gran aceptación ya que permiten mayor seguridad que las anteriormente utilizadas, una vez que el semen es sometido a condiciones semejantes a las que se expone en el tracto genital femenino de la hembra en celo (Dimitropoulos citado por Arruda et al., 1992).

Si bien hoy día existen variaciones de ambas pruebas, no habiendo "recetas", normalmente una muestra de semen puede ser considerada "apta" si luego de 2 horas de incubación mantiene por lo menos un 50% de la motilidad inicial. Hay laboratorios que incuban el semen 4-5 horas y lo consideran aceptables si luego de ese período mantiene entre un 5-10% de espermatozoides con motilidad (Cavestany, 1994).

La motilidad puede ser evaluada mediante dos maneras, de forma subjetiva post descongelado utilizando el microscopio de contraste de fase (400 x) con platina térmica (Gil, 1999), o de forma objetiva mediante la utilización de sistemas computarizados como el CASA (Gil, 1999).

Estabilidad e Integridad de Membrana:

La membrana plasmática del espermatozoide es el principal sitio de lesión que ocurren durante la congelación y descongelación de semen (Hammerstedt et al., 1990; Krogenaes et al., 1994).

La membrana intacta y un funcionamiento activo es esencial para que el espermatozoide pueda mantener el metabolismo, someterse a la capacitación y reacción acrosómica y además, para unir y penetrar en el ovocito a través de la zona pelúcida (Jeyendran et al., 1984; Burks y Sailing, 1992).

La integridad de membrana puede ser evaluada de las siguientes maneras:

1) Test de resistencia osmótica (ORT) o el test de valoración de la funcionalidad acrosomal, es una prueba denominada que permite valorar la integridad del acrosoma al someter los espermatozoides a un medio hiposmótico, de forma que aquellos funcionales no mostrarán alteraciones estructurales evidentes a nivel acrosómico (Correa y Zavos, 1994; Gil et al., 2000; Pérez-Llano et al., 2001).

La evaluación del estado de los acrosomas permite comparar la resistencia osmótica de las membranas de distintos eyaculados, así como medir de manera indirecta la capacidad para soportar la criopreservación (Prathalingam et al., 2005, Schilling, 1995) y predecir el potencial reproductivo del toro (Schiling, 1985, Schiling, 1986). Los resultados se reflejan de manera porcentual, luego de sumar los porcentajes de acrosomas intactos en las muestras evaluadas de ambos grupos y dividirlos entre dos, para obtener así un cociente que representa el porcentaje de resistencia acrosomal al medio hiposmótico (%ORT) (Revell y Mrode, 1994; Pérez-Llano et al., 1998; Gil et al., 2000).

2) una prueba sencilla y rápida es el test de Endosmosis o también llamado HOST (Hypoosmotic Swelling Test), se basa en el concepto fisiológico de la semipermeabilidad de las membranas plasmáticas intactas y bioquímicamente activas de los espermatozoides vivos, las cuales absorben agua cuando son expuestas a una solución hipoosmótica (Vera, 2003; Rota et al., 2000).

Esta puede ser una prueba muy fácil de realizar y evaluar a campo con un solo microscopio óptico disponible. Se proporciona información acerca de la funcionalidad espermática para el análisis de rutina de semen (Pérez-Llano, 1998).

En esta prueba, la membrana de los espermatozoides intactos teóricamente permite la entrada excesiva de agua en el citoplasma, lo que resulta en una variedad de cambios morfológicos del flagelo asociado con la hinchazón citoplasmática. Por el contrario, los espermatozoides que no puedan osmoregular bien, no experimentarán cambios en la forma del flagelo.

Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando

correctamente. En los espermatozoides funcionalmente alterados no se produce la captación selectiva de agua de forma adecuada, alcanzándose así un equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular que no provoca cambios morfológicos apreciables (Madrid-Bury, 2004; Vera, 2003).

Metodología: El semen es incubado 2 horas a 37°C en una solución hiposomótica de fructosa y citrato de sodio. Se realizan observaciones seriadas (horas 0, 1 y 2) entre porta y cubreobjetos, determinándose el % de espermatozoides vivos. Estos reaccionan al shock osmótico enrollando la cola. Debe haber como mínimo un 40% de espermatozoides reaccionantes.

De acuerdo a Correa y Zavos (1994) tras la evaluación de espermatozoides bovinos reactivos al HOST se produce su máxima hinchazón en el nivel de 100 mosm/L.

Generalmente aparece comprometida la integridad de membrana en aquellos casos donde se ha producido algún inconveniente en la conservación del semen como por ejemplo un bajo nivel de nitrógeno líquido en el termo por algún tiempo.

También se han observado casos de alteración de membrana, donde naturalmente la viabilidad post-descongelación se ve afectada, a causa de elevados grados de contaminación con microorganismos inespecíficos que si bien son incapaces de provocar una enfermedad reproductiva, pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides al competir con ellos por el oxígeno y los nutrientes (Catena y Cabodevila, 1999).

3) Hoy día un pool de fluorocromos ha sido desarrollado para evaluar la integridad de la membrana, permitiendo así la diferenciación de células vivas y muertas al mismo tiempo (Garner et al., 1997). De Leeuw et al. (1991) ha aplicado este concepto con éxito para discriminar entre células de la membrana intactas y dañadas.

El estudio de la viabilidad espermática normalmente se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos solo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por lo tanto permite identificar las células muerta o en proceso de degeneración, mientras que el otro no es capaz de atravesar las membranas celulares intactas y por lo tanto permite identificar la población de células viables (Garner et al., 1997).

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el yoduro de propidio (PI). Este compuesto entra en el espermatozoide con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y al ser de excitado por la longitud de onda apropiada, emite fluorescencia roja. Además del PI existen otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas cuyo mecanismo de acción es similar.

Entre los fluorocromos más utilizados para identificar la población de células vivas se encuentra el grupo de las carboxifluoresceínas, 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 carboxifluoresceínas, molécula que al ser excitada a una longitud de onda adecuada, emite fluorescencia verde, quedando retenida intracelularmente por membranas celulares intactas.

Gil et al. (2000) en su estudio propone dos combinaciones de fluorocromos Calcin AM con etidio, y SYBR-14 con yoduro de propideo, para la rutina de laboratorio. La primera combinación es evaluada por microscopio fluorescente y la segunda es evaluada usando microscopio fluorescente y citometría de flujo.

Sanidad

Hay quienes aconsejan realizar controles bacteriológicos y virológicos a espacio de tiempo variables. Barth recomienda determinar la presencia de microorganismos patógenos únicamente cuando hembras fértiles fracasan en ser preñadas con semen de buena viabilidad y morfología, en dosis adecuada o cuando una historia de infertilidad implica una posible causa infecciosa.

Para que una muestra post descongelado pueda ser considerada como de “Calidad Aceptable” y poder ser utilizado para IA, debería cumplir con los siguientes requisitos especificados en la siguiente tabla:

Tabla 9: Parámetros de aceptabilidad para evaluación de semen post descongelado (Derivaux, 1976; Morrow, 1986; Bonadonna, 1989; Barth y Oko, 1989; Ax et al., 2000; Elhordoy y Farías, 2003).

Pruebas	Valores de referencia
Motilidad individual	0hs > 30% de spz móviles (Según ISO 9002 > o = 25%)
	2hs > 20% de spz móviles (Según ISO 9002 > o = 15%)
Vigor (0-5)	0hr > o = 3
	2hs > o = 2
Acrosomía	0hr > 60% acrosomas intactos
	2hs > 40% acrosomas intactos
HOST	> 40% de spz reaccionantes
Morfología y acrosomía*	
Defectos cabeza	< 5-15%
Defectos acrosoma y cola	< 20%
Anormalidades totales	< 25%
Concentración (spz/pajuela)	> 10 millones (muy variable)
Termorresistencia (2hs)	> 50%

(*) El valor asignado para Malformaciones totales por la Facultad de Veterinaria de Uruguay basándose en la escuela sueca es de 20% como máximo Aceptable (Elhordoy, D. Comunicación personal).

HIPOTESIS

Existe una gran variabilidad de métodos utilizados por los laboratorios procesadores de semen bovino (LPS) para conocer la calidad del semen destinado a la comercialización.

OBJETIVOS

1. Identificar las principales técnicas de evaluación de semen que utilizan los laboratorios previo a la comercialización.
2. Conocer los valores mínimos de calidad que se adoptan para semen fresco y congelado.

MATERIALES Y METODOS

La población de estudio fueron los centros de procesamiento de semen (CPS) bovinos y profesionales veterinarios de libre ejercicio especializados en reproducción los cuales fueron identificados a través del la Sección de Reproducción de la DILAVE del MGAP. Estos fueron englobados como laboratorios de procesamiento de semen (LPS). Estos fueron mantenidos bajo anonimato.

Los datos para la investigación fueron obtenidos por una encuesta técnica abierta (Anexo II) completada de forma voluntaria y enviada vía e-mail, durante el período de diciembre del 2011 a noviembre del 2012.

El contenido de la encuesta fue formulado para obtener la siguiente información: Datos generales sobre el centro; los animales; la colecta y el procesamiento de semen (1- pruebas empleadas para evaluar la calidad de muestras de semen, 2- valores de referencia adoptados para cada análisis en particular, 3- tecnologías que LPS tienen la intención de adoptar, 4- existencia potencial de estandarización de las técnicas); evaluación de semen descongelado.

Los resultados se analizaron y fueron compartidos con los participantes en el estudio.

Los resultados son presentados en tablas y graficas, y se elaboraron medidas de resumen, promedios y desvío estándar.

Para los análisis estadístico descriptivos fue utilizado Excel® (programa estadístico de Microsoft, Windows Office 2007). También fueron analizados y discutidos en función de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de quince cuestionarios enviados, fueron contestados completamente 46,7% (7/15), entre los cuales se encuentran 3 veterinarios de ejercicio liberal y 4 centros procesadores de semen. Los resultados se exponen a continuación.

Tabla 10. Métodos y régimen de colecta empleados por los LPS (los LPS del 1 al 3 corresponden a veterinarios de libre ejercicio, mientras que los LPS del 4 al 7 son centros de colecta y procesamiento de semen bovino) (2012).

	LABORATORIOS PROCESADORES DE SEMEN BOVINO							LPS (n/n)	Promedio	Desv. Est.
	1	2	3	4	5	6	7			
Vagina artificial	si	si	si	si	si	si	si	7/7	-	-
Electroeyaculador.	no	no	no	no	no	no	si	1/7	-	-
Regimen (días/semana)	2	2	3	2	3	2	2	-	2,3	-
Salto (a la semana)	4	4	6	6	6	4	4	-	4,9	-

La forma de colecta de semen que utilizan todos los LPS (7/7) es por vagina artificial y uno de ellos también utiliza el electroeyaculador.

La cantidad de saltos a los que se somete a los toros donantes de semen, varía de 4 a 6 saltos por semana según el LPS; el promedio es de 5 ($\pm 1,1$) saltos a la semana. De los 7 LPS 5 hace saltar a los toros 2 días a la semana y los 2 restantes distribuyen los saltos en 3 días a la semana.

Tabla 11. Pruebas de evaluación y valores de referencia adoptados para semen fresco por los laboratorios que procesan semen en Uruguay (2012).

PRUEBAS SEMEN FRESCO	LABORATORIOS PROCESADORES DE SEMEN BOVINO							LPS (n/n)	Promedio	Desv. Est.
	1	2	3	4	5	6	7			
<i>Macroscópicas</i>										
Volumen (ml)	4	5	3	4	4	5	5	7/7	4,3	0,76
Color	si	si	si	si	no	si	si	6/7		-
Densidad (1 a 3)	>1	si	2	>1	si	si	no	6/7	≥ 1	-
Motilidad en masa (0 a 5)	3	4	3	3	3	4	3	7/7	3,3	0,49
Ph	no	no	6,2 a 6,8	no	no	no	6 a 7	2/7	>6 y <7	-
C.E.	no	no	si	si	si	si	no	5/7	-	-
Schaln test	no	no	si	si	no	no	si	4/7	-	-
<i>Microscópicas</i>										
Motilidad en masa microsc. (1 a 5)	>1	4	3	3	3	3	3	7/7	3,2	1,09
Motilidad individual	60%	70%	70%	no	60%	60%	60%	6/7	63%	5,16
Vigor (1 a 5)	3	4	3	3	3	3	3	7/7	3,2	0,39
Concentración (spz/cm ³)	si	si	500 x10 ⁶	500 x10 ⁶	400 x10 ⁶	si	1000 x10 ⁶	7/7	600 x10 ⁶	270,8
Coloración posvital	>70%	no	>70%	no	no	>70%	no	3/7	>70%	-
Anormalidades morfológicas totales	20%	25%	20%	25%	25%	30%	30%	7/7	25%	4,08
Morfología clasificación	no	no	compen	1ª y 2ª	compen	> y <	ubicación		-	-
Integridad acrosoma	no	no	no	no	no	no	max 10%	1/7	max 10%	-
Concentración para congelar (spz/pajuela)	30 x10 ⁶	30 x10 ⁶	50 x10 ⁶	35 x10 ⁶	35 x10 ⁶	25 x10 ⁶	35 x10 ⁶	7/7	34 x10 ⁶	9,62

Tabla 12. Parámetros evaluados por los laboratorios para la evaluación del semen después de descongelado en Uruguay (2012).

PRUEBAS SEMEN DESCONGELADO	LABORATORIOS PROCESADORES DE SEMEN BOVINO							LPS (n/n)	Promedio	Desv. Est.
	1	2	3	4	5	6	7			
Termorresistencia	no	no	30 a 35% 37°C	35% 37°C	0% temp am	40% 30°C	25% 35°C	5/7	33%	5,59
Motilidad individual (valor mínimo)	30%	35%	30 a 35%	si	40%	40%	si	7/7	34,5%	4,39
Vigor (1 a 5)	3	3	2	3	3	3.5	3	7/7	2,8	0,56
Anormalidades morfológicas totales	20%	25%	20%	no	25%	30%	30%	6/7	25%	4,08
Concentración al descongelado (spz/pajuela)	10 x 10 ⁶	15 x 10 ⁶	20 x 10 ⁶	15 x 10 ⁶	15 x 10 ⁶	10 x 10 ⁶	15 x 10 ⁶	7/7	14 x 10 ⁶	4,18
Integridad de acrosoma	no	no	no	no	no	no	si	1/7	-	-
hiposmotic HOST	no	HOST	no	no	no	no	HOST	2/7	-	-

La medición del volumen, motilidad de masa macro y microscópica, vigor, concentración, y morfología fueron las pruebas adoptadas por 7/7 de los LPS para evaluar la calidad del semen fresco.

Los laboratorios adoptan como valor mínimo de volumen del eyaculado 4 a 5 ml de semen. Según Salisbury (1978) el volumen aumenta con la edad y el tamaño corporal del toro, y se modifica con su salud, vigor reproductivo y con la frecuencia de los servicios.

El valor mínimo de la motilidad en masa macroscópica, es mayor o igual a 3 y 4 según el laboratorio. La escala utilizada para esta medición es del 0 (no hay ondas, semen sin movimiento) al 5 (Movimientos masivos muy marcado y rápidos 70-100%).

Para la motilidad en masa microscópica se observaron los mismos resultados, utilizando una escala similar, 0 (Escaso o ningún movimiento) al 5 (Movimiento en ondas vigoroso y en remolinos).

La prueba de la evaluación del vigor usada por 7/7 de los LPS constituye un signo importante de vitalidad y calidad del esperma. Tomaron como valor mínimo promedio para semen fresco 3,2 y para semen descongelado 2,8.

Sin embargo Derivaux (1976) indico que no se trata de un valor absoluto, ya que este test puede variar dentro de amplias proporciones por ejemplo al variar la temperatura durante la técnica, siendo por lo tanto un valor muy subjetivo.

De acuerdo a Folhadella et al. (2006) existe alta correlación entre la motilidad y el vigor, y puede ser explicada por ser variables del metabolismo espermático.

La motilidad progresiva individual, que es uno de los principales parámetros asociado a la fertilidad de las muestras (Rodríguez-Martínez, 2005) fue evaluada por 6/7 tanto sobre semen fresco como descongelado; por lo tanto fue reportado por la mayoría de los laboratorios.

Un estudio similar realizado por Phillips et al. (2004a) en Australia sobre semen descongelado reveló que el 100% de los laboratorios evalúan motilidad progresiva individual y el 94% morfología normal.

Crespilho et al. (2009) también realizó un estudio de similares características en Brasil, y reportó que el 85.7% de los laboratorios encuestados adoptan como los parámetros más evaluados para semen descongelado la motilidad progresiva individual y concentración de espermatozoides/pajuela.

Ambos autores obtuvieron resultados concordantes con nuestros hallazgos.

Estos resultados coinciden con el trabajo de Rodríguez-Martínez (2006), quien afirma que cuanto mayor sea el número de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme, es mejor, ya que éste se asocia a la capacidad de migración a través del aparato reproductivo femenino.

Sin embargo la valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen (Liu y Foote, 1998), es sólo uno de los requisitos que ha de cumplirse; de ahí que la correlación existente entre la motilidad de una muestra de semen y su fertilidad real, sea significativamente baja (Kjaestad et al., 1993).

De acuerdo a Holt y Van Look (2004) los espermatozoides con actividad flagelar normal son capaces de cruzar la unión útero tubárica y entrar en el oviducto, pero los espermatozoides que posean una función anormal flagelar son incapaces de hacerlo.

Según el relevamiento efectuado, los porcentajes mínimos aceptados para motilidad progresiva individual de los espermatozoides, fue promedialmente de 63% ($\pm 5,16$) y 34,5% ($\pm 4,39$), para semen fresco y descongelado respectivamente.

En el trabajo de Phillips et al. (2004a) antes mencionado, los valores de aceptación utilizados para motilidad progresiva individual post descongelado oscilan entre 20-50% (promedio 37% de espermatozoides móviles).

Para inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), Bó et al. (2005) recomendaron el uso de dosis que tengan más de 30% de motilidad progresiva individual al descongelado.

Una buena motilidad progresiva individual de los espermatozoides está asociada a un correcto metabolismo e integridad de membrana (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004), así como a una baja incidencia de acrosomas anormales (Barnanbé, 1981).

La resolución N° 46/96 del Mercosur (1996), considera 30% de motilidad progresiva como el valor de referencia mínimo aceptable para las muestras después de la descongelación de semen bovino. En la tabla 12 se muestra que en promedio los laboratorios adoptaron valores 4,5% superiores a lo establecido en la mencionada resolución, y existe concordancia en relación a los límites mínimos adoptados (de 30% a 40%, media 34.5%) para el parámetro motilidad individual.

De la encuesta surge que la prueba de integridad de acrosoma la realiza un solo LPS, tomando un máximo de 10% de acrosomas defectuosos como límite.

Un acrosoma intacto post descongelado es crucial para la fertilización (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

La integridad de membrana es evaluada por 3/7 a través de la prueba de coloración post vital, tomando como aceptable un mínimo de 70% de espermatozoides vivos. Para ello 2/7 utilizan Eosina-Nigrosina, y un tercer laboratorio utiliza Eosina-Nigrosina o Azul de Anilina de forma indistinta.

Y 2/7 realizan HOST sobre semen descongelado. Ha sido recientemente demostrado que la prueba HOST, resulta ser útil en la detección de cambios sutiles de las membranas de los espermatozoides de toro y carnero (Nur et al., 2003). Se puede decir que la prueba HOST es complementaria a la prueba de coloración post vital, ya que la primera es usada para evaluar la actividad bioquímica de la membrana, mientras que la prueba post vital evalúa el daño físico de la membrana plasmática (Brito et al., 2003).

Según lo expresado por los encuestados estas pruebas no se realizan de rutina, se hacen únicamente cuando existe viabilidad cuestionable de los espermatozoides.

Para que el espermatozoide sea considerado cualitativamente viable y potencialmente fértil es necesario que posea morfología, actividad metabólica y membranas plasmáticas normales. La presencia de membranas integras es un pre requisito para que los eventos relacionados a procesos de fertilización, como la capacitación espermática, penetración de los revestimientos del ovocito, unión con la zona pelúcida y fusión de la membrana puedan ocurrir (Rodríguez- Martínez et al., 1997). Una vez dañado, los espermatozoides no son capaces de volver a sellar el plasmalema comprometido (Woelders, 1991), y por lo tanto, no puede mantener las concentraciones de iones y co-factores esenciales para la supervivencia de los mismos (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

El éxito de la criopreservación de semen de toro depende de numerosos factores, como los crioprotectores, velocidad de refrigeración/congelación y descongelación, y los medios para minimizar los efectos perjudiciales de la criopreservación (Andrabi, 2007).

La membrana plasmática es el sitio primario de lesión en los espermatozoides criopreservados y su principal daño se produce durante la congelación y descongelación (Graham y Parkes, 1992). Resultando en la pérdida sustancial de espermatozoides viables (Bailey et al., 2003). Esta vulnerabilidad se debe a lípidos y proteínas en la membrana que no están unidos covalentemente y pueden moverse fácilmente.

Habitualmente, la coloración con eosina o la prueba de endosmosis (HOST) se utilizan para evaluar membranas espermáticas. Woelders (1991) sugiere un marcador fluorocromico para eludir los problemas de una concentración tóxica del colorante y una evaluación microscópica subjetiva

La criopreservación optimiza la técnica de IA proporcionando un sistema de almacenamiento de semen a largo plazo. Pero la reducción de la fertilidad asociada a la IA con semen congelado es atribuida a técnicas de congelación que producen daños ultraestructurales, físicos, bioquímicos o funcionales en los espermatozoides (Watson, 1995). Los daños irreversibles a la membrana plasmática y acrosomal causan muerte e infertilidad celular (Rubio-Guillén, 2009).

Según Gonzales (2004), el 85% de los espermatozoides bovinos presentes en una muestra de semen, sufren algún tipo de daño durante el procedimiento de congelación y descongelación.

Para el cálculo de la concentración, 4/7 utilizo cámara de Neubauer, 2/7 espectrofotómetro y 1/7 cámara Makler.

Según lo expresado por los encuestados y en concordancia con lo manifestado por otros autores, la concentración espermática mínima por dosis para congelar semen bovino oscila entre 400 y 1000×10^6 spz/cm³ y en promedio fue de 600×10^6 spz/cm³ ($\pm 270,80$) sobre el eyaculado.

Por otro lado el número de espermatozoides para congelar por pajuela de inseminación presento gran variación, los resultados indicaron una media de 34×10^6 spz/pajuela y un desvío de $9,62 \times 10^6$ spz/pajuela; el rango fue de 25 a 50×10^6 spz/pajuela.

El número de espermatozoides por pajuela post descongelado presento un rango que va de 10 a 20×10^6 spz/pajuela, con un promedio de 14×10^6 y un desvío de $4,18 \times 10^6$ spz/pajuela.

A continuación se grafican las concentraciones para congelar pajuelas y al descongelado para cada caso individual.

En la figura 10 se exponen el número de espermatozoides viables por los LPS encuestados para congelar en pajuelas y aceptables al descongelado para cada caso individual.

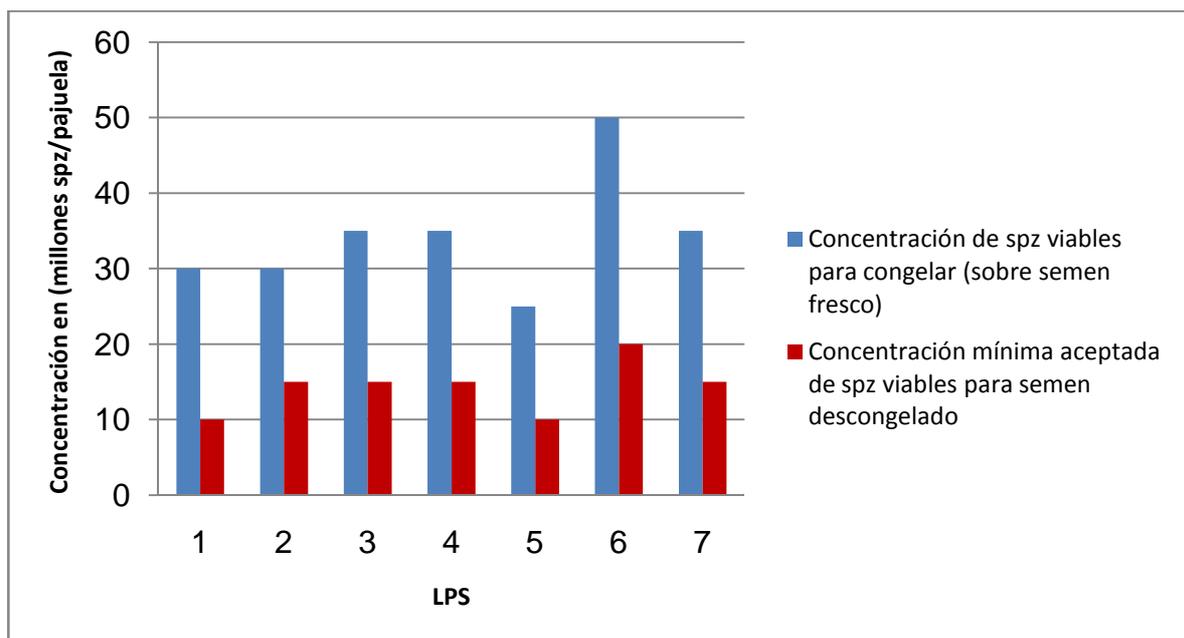


Figura 10: Comparación entre las concentraciones espermáticas viables en pajuelas pre y post congelado de LPS en Uruguay. En el eje de las abscisas se encuentran los LPS numerados individualmente del 1 al 7 (Curbelo y Rodríguez, 2013).

De cualquier manera un mismo lote contiene variaciones del número de spz debido a fallas en la homogenización antes de diluir o luego del llenado de las pajuelas, resultando en muestras con altos y bajos números de células espermáticas (Crespilho et al., 2009).

Salisbury (1978) propone que a medida que aumenta la concentración espermática por dosis inseminante hasta llegar a un umbral óptimo, la correlación entre la

concentración espermática y la tasa de fertilidad cesan, por lo que ya no existiría relación entre ambas.

Por el contrario con una relativamente baja concentración espermática pequeños cambios producen importante variación en la fertilidad.

Dosis de inseminación con alto número de espermatozoides, tal vez influyan en el número de estos que accedan al ovocito bovino, resultando en una alta fertilidad y tasas de embriones de calidad. De acuerdo a Dalton (1999), una de las alternativas para mejorar las eficiencias de la IA es aumentar el número de espermatozoides por dosis inseminante.

Saacke (2008) propone que el número de espermatozoides viables para obtener una buena fertilidad varía en cada toro. Se observa en la grafica 8.

Altas tasas de concepción de vacas en IATF con incremento de la concentración han sido reportadas por Albretch et al (2005) y Crespilho (2007), sugiriendo el uso de un alto número de espermatozoides por pajuela para IA.

Hay que tener en cuenta que alrededor del 40-50% de la población de espermatozoides de los mamíferos no sobrevive a la criopreservación, incluso con los protocolos optimizados (Watson, 2000).

Para la inseminación artificial, una dosis mínima de 10×10^6 de espermatozoides con movimiento progresivo por pajuela al descongelado debe garantizar máxima fertilidad de los toros individuales (Christensen et al., 1999), incluso algunos autores afirman que bajo buenas condiciones de recolección, procesamiento e inseminación, la tasa de fecundidad se mantiene con 5×10^6 de espermatozoides con movimiento progresivo (Foote y Kaproth, 1997).

Gerard y Humblot (1991) encontraron que se reduce la fertilidad cuando se llega a 7×10^6 espermatozoides con movimiento progresivo por pajuela al descongelado.

Foote y Kaproth (1997) publicaron un trabajo donde se evidencia la falta de diferencias significativas para la fertilidad, cuando se utilizaron valores de 16×10^6 y de 12×10^6 espermatozoides con movimiento individual. En el mismo trabajo, tampoco hubo diferencias significativas al usar 16×10^6 y 10×10^6 espermatozoides con movimiento individual.

Según Elliott (1978) y Saacke et al. (1991), la inseminación de 10×10^6 espermatozoides móviles (descongelado) permite suficiente colonización del oviducto y cualquier incremento en la dosis es probable que tenga poco efectos sobre la fertilidad observada. De acuerdo a estos investigadores es el número de espermatozoides móviles inseminados, y no el porcentaje de espermatozoides móviles, el que probablemente esté más relacionado con la fertilidad.

Saacke et al. (1994) y Den Daas (1997) han postulado que las diferencias en la motilidad del espermatozoides se compensa completamente con la inseminación de más de 10×10^6 células móviles y que las diferencias en la fecundidad es probable que sea causada por factores no compensables.

Crespilho (2007) enfatiza la influencia negativa de altas concentraciones por pajuela para la evaluación objetiva de motilidad espermática debido a superposición y

colisión entre las células. Esto sugiere que para la evaluación subjetiva de la motilidad puede haber un defecto similar.

Las anomalías morfológicas de los espermatozoides pueden tener un impacto perjudicial sobre la fertilización y el desarrollo embrionario (Saacke, 2008). La determinación de estos parámetros posee un alto valor diagnóstico, pues se ha comprobado que la incidencia de espermatozoides anormales en el eyaculado tiene una relación directa con la fertilidad bovina (Söderquist et al., 1991).

Con respecto a la evaluación morfológica, los resultados indicaron que se realiza la prueba en 7/7 para semen fresco, mientras que 6/7 en el semen descongelado. El límite de referencia o nivel de aceptación es en promedio de 25%, con un rango que va de 20 a 30% de malformaciones totales.

Las pruebas utilizadas fueron la de contraste de fase realizada por 5/7 y la de tinción por los 2/7 restantes.

Algunos LPS señalaron que no realizan de rutina la evaluación morfológica, solamente en casos puntuales como para algunos toros de importante valor genético o ante la existencia de algún problema o duda.

Son 5 de los 7 laboratorios que clasifican a las anomalías espermáticas. 2/5 clasifican en defectos compensables y no compensables, 1/5 en primarios y secundarios, 1/5 en mayores y menores, y 1/5 por la ubicación del defecto en el espermatozoide.

En la actualidad, quizás lo más adecuado sea identificar cada una de las anomalías por su ubicación dentro de la estructura del espermatozoide y la relación de cada una de ellas con la fertilidad, para lo cual aún se requieren muchos estudios para poderlo dilucidar fehacientemente en todos los casos (Barth, 2005).

Para una interacción normal del espermatozoide con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides deben ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte alguna de las características del espermatozoide puede dificultar su migración por el tracto genital de la hembra e impedir su unión con el ovocito (Rodríguez-Martínez, 1999).

A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, disminuye la capacidad fecundante del mismo (Morrow, 1986).

De acuerdo a Barth y Oko (1989) y Saacke (2008), las muestras de semen deben presentar un mínimo de 75 % de espermatozoide morfológicamente normales.

Ante la pregunta planteada a los técnicos de si piensan incorporar nuevas tecnologías, 2 sí planean hacerlo. Entre estas se incluyen espectrofotómetro (2/7 ya cuentan con éste) y microscopio de contraste de fase (5/7 ya lo utilizan).

Según expresan los laboratorios, la negativa a realizar pruebas más complejas como son HOST, fluorocromos, FIV (fertilización in vitro), CASA (sistemas de análisis de semen asistido con computadora) y otras se debe a la relación costo beneficio. Generalmente este tipo de pruebas se hacen de rutina en países cuyos toros, tienen mayor demanda, lo que amerita una tasa máxima de dilución y por ende las pruebas de calidad biológica a que hay que someterla son múltiples para asegurar su fertilidad.

Los tests de inseminación artificial o de FIV representan técnicas de mayor sensibilidad para la predicción de la fertilidad potencial de las muestras seminales (Barth y Oko, 1989; Crespilho et al., 2009) y permiten la evaluación simultánea de los requisitos más importantes de la célula espermática para el proceso de fertilización (Rodríguez- Martínez, 2005). Sin embargo, el alto costo y pérdida de tiempo, agregando la complejidad y la dependencia de estabilidad laboratorial impuesta por los FIV (Hallap et al., 2004; Rodríguez Martínez, 2005), tornan impracticables la adopción de estos métodos en la rutina de análisis de semen bovino. En nuestro relevamiento ninguno de los LPS lo realiza.

De acuerdo a Barth y Oko (1989), no debería ser pasado por alto en casos especiales en los que los métodos de evaluación de laboratorio no son suficientemente concluyentes para determinar el potencial de un toro o semen conservado.

El uso del test de termorresistencia para el semen descongelado, de acuerdo a los datos obtenidos es empleado por 4/7 de los laboratorios.

Estos LPS toman como límite aceptable entre 30 y 40% ($33 \pm 5,59$) de espermatozoides móviles, el tiempo que tienen la muestra espermática en baño María es de 2 horas y el rango de temperatura es de 30 a 37°C ($35 \pm 3,30$).

Uno de ellos calcula el porcentaje de espermatozoides móviles a la hora, 2 horas y 3 horas; exigiendo valores mínimos de 40%, 30 a 35% y 10% respectivamente.

Se nos transmitió que en el caso de utilizarse diluyentes sintéticos las exigencias son menores o directamente no se realiza el test de termorresistencia, debido a la falta de elementos orgánicos por parte de dichos diluyentes, el metabolismo celular es tan intenso que los espermatozoides se agotan antes de las 2 horas.

Estimamos que la causa por la que este test no es realizado por todos los laboratorios, es el tiempo requerido para ello.

Vianna et al. (2009) observo que hay baja correlación entre el % de motilidad de espermatozoides bovinos tras el test de termorresistencia rápida o lenta, y la tasa de concepción después de IA en vacas.

Sin embargo Arruda et al. (1992), obtuvo resultados favorables con respecto a la correlación entre las tasas de preñes y la prueba de termorresistencia. Este también obtuvo resultados satisfactorios en la correlación existente entre los test de termorresistencia rápida y lenta, por lo que el test de termorresistencia rápida podría sustituir al lento ya que no hay diferencias significativas en la tasa de preñes de las hembras inseminadas. Barnabé et al. (1981) considera que el más adecuado es el test rápido (46°C durante 30min.) porque el semen de determinados toros puede presentar buena tasa de fertilidad a pesar que muestren valores bajos en la prueba lenta.

Por lo tanto creemos que sería una buena opción para los laboratorios utilizar la prueba rápida

Cuando realizamos la pregunta de si existe necesidad de establecer un protocolo de evaluación estándar, 2/7 de los encuestados, respondió afirmativamente, mientras que el 2/7 restante respondió que no. Estos últimos fundamentan su respuesta en su satisfacción con los criterios actuales de evaluación y en la subjetividad de muchas de las pruebas ejecutadas debido a la variación entre los técnicos, laboratorios y equipos.

Según algunos autores hay pocos parámetros individuales indicadores de viabilidad espermática que tiene una correlación positiva significativa con la fertilidad de la muestra de semen (Amann y Hammerstedt, 1993).

Según Bó et al. (2005), todavía no existe ninguna prueba suficientemente objetiva y precisa para determinar el potencial de fertilidad de una muestra de semen congelado. Sin embargo el uso de un conjunto de pruebas, puede acercarnos más al potencial real de fertilidad de una muestra espermática.

No se observaron variaciones entre los centros y los veterinarios de libre ejercicio, en las pruebas y valores empleados.

De acuerdo a nuestro estudio observamos que la prueba de evaluación de la integridad de la membrana plasmática que monitorea los daños que se producen durante la criopreservación y descongelación solo la realizan 3/7 del total de LPS.

CONCLUSIONES

Los datos sugieren que se utiliza un protocolo de evaluación de semen diferente dentro de cada laboratorio, ya sea para pruebas de evaluación de calidad seminal, metodologías de las mismas y que existe variación en los valores límites en los distintos parámetros evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aisen, E.G.; Medina, V.H.; Venturino, A. (2002) Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology* 57:1801-1808.
2. Aitken, R.J. (1995) Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development* 7:659-68.
3. Albrecht, A.; Cavia R.; Larraburu, G. (2005) Heterospermic insemination at two sperm concentrations in timed AI: CASA semen parameters and pregnancy rates. Conference of the International Embryo Transfer Society, XVII. Copenhagen, Denmark. Abstract. Copenhagen: IETS. p.154
4. Alvarenga, M.A.; Keith, S.L.; Graham, J.K.; Landim-Alvarenga, F.C.; Squires, E.L. (2000a) Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *International Congress on Animal Reproduction*. 14, Stockholm, Proceedings. Stockholm. pp. 74-76. Disponible en: <http://www.havemeyerfoundation.org/PDFfiles/Brewster%20Monograph.pdf#page=86> Fecha de consulta: 8/01/2013.
5. Alvarenga, M.A.; Landim-Alvarenga, F.C.; Moreira, R.M.; Cesarino, M.M. (2000b) Acrossosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal* 32(6):541-545.
6. Amann R. P.; Hammerstedt R. H. (1980) Validation of a system for computerized measurements of spermatozoa velocity and percentage of motile sperm. *Biology of Reproduction* 23:647-656.
7. Amann, R.P.; Hammerstedt, R.H. (1993) In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology* 14:397-406.
8. Anchoroguy, T.J.; Rudolph, A.S.; Carpenter, J.F.; Crowe, J.H. (1987) Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. *Cryobiology* 24:324-331.
9. Andrabi, S.M. (2007) Fundamental principles of cryopreservation of *Bos Taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *International Journal of Agriculture and Biology* 9(2):367-369.
10. Arruda, P.R.; Andrade, A.F.C.; Celeghini, E.C.C.; Zaffalon, G.; Tarragó, O.F.B. (2007) Avaliação de sêmen fresco e congelado. Simpósio Brasileiro de reprodução assistida em caprinos e ovinos, Gravatá, PE. Anais. Gravatá, PE: Rebanho Caroaá e Caroaá Genética. Tecnologia e Ciência Agropecuaria 3(2):53-63.
11. Arruda R.P. (2000) Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computarizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). (Livre docência), Tese de pós-graduação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 121p.

12. Arruda, R.P.; Barnabe, V.H.; Alencar, M.M.; Barnabe, R.C. (1992) Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termoresistência: efeitos sobre a fertilidade. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 29(1):131- 137.
13. Arruda, R.P.; Celenghini C.C.E.; Andrade, A.F.C; García, A.R.; Nascimento, J.; Raphael, C.F.; Souza, L.W.O. (2000) Importância da qualidade do semen em programas de IATF e TETF. Simpósio internacional de reprodução animal aplicada. 1º Laboratório de biotecnologia do semen e andrologia, centro de biotecnologia em reprodução animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. pp166-179.
14. Arthur, G.H.; Noakes, D.E.; Pearson, H. (1991) *Reproducción y Obstetricia Veterinaria*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana. 702p.
15. Ávila-Portillo, L.M.; Madero J.I.; López, C.; León M.F.; Acosta L.; Gómez C.; Lozano, J.M.; Reguero, M.T. (2006) Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57:291-300.
16. Ax R.L.; Dally M.R.; Didion B.A.; Lenz R.W.; Love C.C.; Varner D.D.; Hafez B.; Bellin M.E. (2000a) Evaluación del semen. En: Hafez, E.S.; Hafez. B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*, 7ºed. Mexico, McGraw-Hill Interamericana pp. 375-386.
17. Ax R.L.; Dally M.R.; Didion B.A.; Lenz R.W.; Love C.C.; Varner D.D.; Hafez B.; Bellin M.E. (2000b) Inseminación artificial. En: Háfész, E.S.; Háfész. B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ºed. Mexico, McGraw-Hill Interamericana pp. 387-400.
18. Bailey, J. L.; Bilodeau, J. F.; Cormier, N. (2000) Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* 21(1):1-7.
19. Bailey, J.L.; Morrie, A.; Cormier, N. (2003) Semen cryopreservation: success and persistent in farm species. *Canadian Journal of Animal Science* 83:393-401.
20. Bailey, J.L.; Robertson, L.; Buhr, M.M. (1994) Calcium regulation, computerize motility parameters and the fertility of bovine spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science* 74:53-58.
21. Ball, B. A.; Medina, V.; Gravance, C. G.; Baumber, J. (2001a) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology* 56:577-589.
22. Ball, B. A.; Vo, A.; Baumber, J. (2001b) Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 62:508-515.
23. Ball, B. A.; Vo, A. (2001c) Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology* 22:1061-1069.

24. Ball, B. A.; Baumber, J., Sabeur, K. (2002) Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology* 58:299-300.
25. Baracaldo, M. I.; Barth, A. D.; Bertrand, W. (2007) Steps for freezing bovine semen: from semen collection to the liquid nitrogen tank. Disponible en: <http://www.ivis.org/reviews/rev/baracaldo/chapter.asp?la=1> Fecha de consulta: 30/10/2012.
26. Barnabé, V.H.; Barnabé, R.C.; Viana, W.G.; Visitin, J.A.; Casagrande, J.F.; Almeida, C.A. (1981) Correlations between progressive motility and acrosomal retention after thawing and after incubation at 38°C or 45°C of frozen bull semen. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Pablo* 18:61-68.
27. Barth, A. D. (2007) Evaluation of potential breeding soundness of the bull. En: Youngquist, S.; Walter, R. Threlfall. *Current therapy large animal theriogenology*. Saskatchewan, Saunders Elsevier-Interamericana.1061p.
28. Barth, A.D.; Oko, R.J. (1989) *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames, IA, Iowa State University Press. 285p.
29. Batellier, F.; Vidament, M.; Fauquant, J.; Duchamp, G.; Arnaud, G.; Yvon, J. M.; Magistrini, M. (2001) Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* 68:181-190.
30. Baudot, A.; Caula, C.; Duarte, M. L.; Fausto, R. (2002) Thermal study of simple aminoalcohol solution. *Cryobiology* 44:150-160.
31. Baumber, J.; Sabeur, K.; Vo, A.; Ball, B.A. (2003) Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 60:1239-1247.
32. Bicudo, S.D.; Azevedo, H.C.; Maia, S.M.; Green, R.E.; Rodello, L.; Meira, C. (2007) Avanços na criopreservação do semen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. *Acta Scientiae Veterinariae* 35(3):787-798.
33. Bilodeau, J.F.; Blanchette, S.; Corner, N.; Sirad, M.A. (2002) Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 57:1105-1122.
34. Bó, G.; Cutaia, L.; Chesta, P.; Balla, E.; Picinato, D.; Peres, L.; Marañas, D.; Avilés, M.; Menchaca, A.; Veneranda, G.; Baruselli, P. (2005) Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría de Argentina. *Proceedings VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC, Argentina*. pp. 97-128.
35. Bonadonna, T. (1989) *Reproducción animal e inseminación artificial*. 2ª ed. Buenos Aires. Hemisferio Sur, 2v.

36. Brito, L.F.; Barth, A.D.; Bilodeau-Goeseels, S.; Panich, P.L.; Kastelic, J.P. (2003) Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60(8):1539-1551.
37. Buettner, G.R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysic* 300:535-543.
38. Burks, D.J.; Sailing, P.M. (1992) Molecular mechanisms of fertilization and activation of development. *Animal Reproduction Science* 28:79-86.
39. Catena, M.; Cabodevila J. (1999) Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus*. 1(3):18-31.
40. Cavestany, D. (1994) *Procesamiento y Congelación de Semen de Toro*. Montevideo. Santa Catalina 23p.
41. Centro de Inseminación Artificial de Venado Tuerto (CIAVT) (1987) *Manual de Inseminación*. 3ª ed. Buenos Aires, Centro de Inseminación de Venado Tuerto. 167p.
42. Chaveiro, A.; Machado L.; Frijters A.; Engel B.; Woelders, H. (2006) Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmolytic supports. *Theriogenology*, 65:1875-1890.
43. Chemineau, P.; Cagnie, Y.; Guerin, Y.; Orgeur, P.; Vallet, J.C. (1991) *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v3_n2_jun/tca10_esperma.pdf
Fecha de consulta: 09/01/2013.
44. Christensen, P.; Brockhoff, P.B.; Lehn-Jensen, H. (1999) The relationship between semen quality and the non return rate of bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. 34:503-507.
45. Clarkson, P.M.; Thompson, S. (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *American Journal of Clinical Nutrition* 72:637-646.
46. Cooter, P.Z.; Goolsby, H.A.; Priend, S.D. (2005) Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 40:98-99.
47. Correa, J.R.; Zavos, P.M. (1994) The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*. 42:351-360.
48. Crespilho, A.M. (2007) *Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do semen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo- fixo (IATF)*. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Sao Paulo, Brazil. 112p.

49. Crespilho, A.M.; Papa, F.O.; Martins, A.; Dell'Aqua Junior, J.A. (2009) Evaluation of frozen bovine semen: how do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? *Veterinária e Zootecnia*. 16(2):335-342.
50. Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, J.F.; Aurellwistrom, C. (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemistry Journal*. 242:1-10.
51. Dalimata, A.M.; Graham, J.K. (1997) Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, 48:831-841.
52. Dalton, J.C. (1999) Factors important to the efficiency of artificial insemination in the single - ovulating and superovulated cattle. Dissertation (Doctor in Animal Science) Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA. 136p.
53. De Lamirande, E.; Jiang, H.; Zine, A.; Kodama, H.;Gagnon, C. (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*. 2:48-54.
54. De Leeuw, F.E.; De Leeuw, A.M.; Den Daas, J.H.G.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. (1993) Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30:32-44.
55. De Leeuw, A.M.; Den Daas J.H.; Woelders, H. (1991) The fix vital stain methods. *Journal of Andrology* 12:112-118.
56. Den Daas, J.H. (1992) Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science* 28:87-94.
57. Den Daas, J.H. (1997) Prediction of bovine male fertility. Thesis. University of Wageningen. The Netherlands. Disponible en: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/947510> Fecha de consulta: 17/01/2013.
58. Denvireddy, R.V.; Swalund, D.J.; Olin, T.; Vincent, W.; Troedson, M.H.; Bischof, J.C.; Roberts, K.P. (2002) Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. *Biology of Reproduction* 66:222-231.
59. Derivaux, J. (1976) Reproducción de los animales domésticos. 2º ed. Zaragoza, Acribia. 486p.
60. Durán del Campo, A. (2001) Historia de la inseminación artificial en vacunos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 36 Suplemento: 5-23.
61. Elhordoy, D.; Nan, E.; Hernández, L.; Hernández, S.; Acuña, R. (2010) Testosterone concentration, scrotal circumference and seminal parameters in yearling Hereford bulls in Uruguay. 26º World Buiatrics Congress, Santiago, Chile pp.14-18.
62. Elhordoy, D.; Farías, D. (2003) Manual de Inseminación Artificial en Bovinos. Montevideo. Facultad de Veterinaria, Oficina Publicaciones. 95p.

63. Elhordoy, D.; Haedo, F. (1983) Experimental testicular degeneration in bulls. Proceeding 15^o FAO/SIDA Posgraduated Course. Veterinary College. Uppsala. Suecia. 1:365-369.
64. Elliott, F.I. (1978) Significance of semen quality. En: Salisbury, W.G.; Van Demark, N.L.; Lodge, J.R. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. San Francisco, Freeman. p428-441.
65. Evans, G.; Maxwell, W.M. (1987) Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Wellington: Butterworths. 194p.
66. Folhadella, I.M.; Sá, W.F.; Ferreira, A.M.; Camargo, L.S.; Viana, J.H.; Ramos, A.A.; Silva, M.V. (2006) Características andrológicas de touros da raça Gir. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 58(5):809-815.
67. Foote, R.H.; Kaproth, M.T. (1997) Sperm numbers insemination in dairy cattle and non return rates revised. Journal of Dairy Science. 80:3072-3076.
68. Freitas-Dell'Aqua, C.P.; Crespilho, A.M.; Papa, F.O.; Dell'Aqua J.A. (2009) Metodologia de avaliação laboratorial do semen congelado bovino. Reproduction Animal, Belo Horizonte 33:4213-222.
69. Garner, D.L.; Glendhill, B.L.; Pinkel, D.; Lake, S.; Stephenson, D.; Van Dilla, M.A.; Johnson, L.A. (1983) Quantification of the X and Y chromosome bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. Biology of Reproduction 28:312-321.
70. Garner, D.L.; Hafez, E.S. (2000) Espermatocitos y plasma seminal. En: Hafez, B.; Hafez, E.S. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ed. México. Interamericana-McGraw-Hill. 98-112p.
71. Garner, D.L.; Thomas, C.A.; Allen, C.H.; Senger, P.L.; Sasser, R.G. (1997) Effect of cryopreservation on bovine sperm as determined by dual DNA staining. Reproduction in Domestic Animals 32:279-283.
72. Gerard, O.; Humblot, P. (1991) Influence of interactions between semen extender and number of spermatozoa on non return rate estimates of fertility for individual Holstein bulls. Theriogenology 36:727-736.
73. Gil, J. (1999) Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing. Licenciante thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 29p.
74. Gil, J.; Januskaukas, A.; Haard, M.; Johansson, A.; Söderquist, L.; Rodriguez-Martinez, H. (2000) Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-plus[®] and Triladyl[®]. Reproduction in Domestic Animals 35:69-77.
75. Gómez, M.; Migliorisi A.L. (2010) Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Cátedra Reproducción Animal, Facultad de Ciencias. Veterinarias - UNLP. Disponible en: <http://www.produccion->

animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf

Fecha de consulta: 22/08/2012.

76. Gonzales, R.A.F. (2004) Effect of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on sperm parameters and membranes integrity of bovine spermatozoa. Tese. Programa de Pos-Graduação em Medicina Veterinaria, Universidade Sao Paulo. Pirassununga, Sao Paulo. 94p. Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-19102004-101719/pt-br.php> Fecha de consulta: 12/11/2012.
77. Graham, J.K. (2001) Assessment of sperm quality. Proceedings of the American Association of Equine Practitioners 47:302-305.
78. Graham, J.K. (1996) Cryopreservation of stallion spermatozoa. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 12:131-147p.
79. Graham, J.K.; Mocé, E. (2005) Fertility evaluation of frozen/thawed semen. Theriogenology 64:927-504.
80. Graves, C.N. (1978) El semen y sus componentes. En: Salisbury G.W., VanDemark N.L.; Lodge J.R. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en bóvidos, 2º ed. Zaragoza, Acribia. pp.258-298.
81. Guerra, M.M.; Evans, G.; Maxwell, W.E. (2004) Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de literatura). Revista Brasileira de Reprodução Animal 28:187-195.
82. Hafez, E.S. (2000) Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez, B.; Hafez, E.S. Reproducción e inseminación artificial en animales, 7a ed. Mexico. McGraw-Hill Interamericana. pp.441-452.
83. Hallap, T.; Haard, M.; Jaakma, U.; Larsson, B.; Rodríguez-Martínez, H. (2004) Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? Theriogenology 62:702-713.
84. Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Journal of Andrology 11:73-88.
85. Holt, W. (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 53:47-58.
86. Holt, W.V.; Van Look, J.W. (2004) Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. Reproduction 127:527-535.
87. Irvine, D.S. (1995) Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. Human Reproduction 10:53-59.
88. Januskauskas A.; Johannisson A.; Rodríguez-Martínez, H. (2001) Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. Theriogenology 55:947-961.

89. Januskauskas, A.; Söderquist, L.; Haard, M.G.; Haard, M.C.; Lundeheim, N.; Rodríguez-Martínez, H. (1996) Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of the Swedish Red and White AI bulls. *Acta Veterinaria Scandinavica* 37:461-470.
90. Januskauskas, A.; Zilinskas, H. (2002) Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bulls fertility. *Veterinarija ir Zootechnika* 39:1-8.
91. Jeyendran, R.S.; Van der Ven, H.H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B.G.; Zanevald L.J. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70:219-228.
92. Johnson, L.A.; Flook, J.P.; Hawk, H.W. (1989) Sex preselection in rabbit: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction* 41:199.
93. Kagan, V.E.; Serbinova, E.A.; Forte, T.; Scita, G. (1992) Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 33:385-397.
94. Kjaested, H.; Ropstad, E.; Andersen-Berg, K. (1993) Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* 34:299-303.
95. Krause, W. (1995) The significance of Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Human Reproduction* 10:60-66.
96. Kroestch T. G.; Stubbing R. B. (1992) Sires and insemination dose does effect in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 37:240-244.
97. Krogenaes, A.; Andersen-Berg, K.; Hafne, A.L.; Engeland, E. (1994) Membrane alteration in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Veterinaria Scandinavica* 35:17-26
98. Leboeuf, B.; Restall, B.; Salamon, S. (2000) Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62:113-141.
99. Linford E.; Glover , F.A.; Bishop, C.; Stewart, D.L. (1976) The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility* 47(2):283-291.
100. Liu, Z.; Foote, R.H. (1998) Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *Journal Dairy Science* 81:1868-1873.
101. Madrid-Bury, N. (2004) Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria. pp1-164.
102. Maia, M. S. (2003) Espécies reativas do metabolismo do oxigênio,

- antioxidantes e função espermática. Tese Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP– Sao Paulo. 23p.
103. Maxwell, W.M.; Stojanov, T. (1996) Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction and Fertility Development* 8:1013-1020.
 104. Mazur, P. (1985) Basic concepts in freezing cell. En: Johnson, L.A.; Larsson, K. Deep freezing of boar semen. *Proceeding. International Conference Deep Freezing of Boar Semen*. Uppsala, SLU. pp.91-111.
 105. Medeiros, C.M.; Forell, F.; Oliveira, A.T.; Rodrigues, J.L. (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57:327-344.
 106. Melo, M.; Henry, M. (1999) Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia* 51(1):71-78.
 107. MERCOSUR (1996). Resoluciones del Grupo Mercado Común del Sur MERCOSUR/GMC/RES N° 46/96: Marco regulatorio para el tratamiento de la genética animal de bovinos, caprinos, ovinos, équidos y porcinos en el Mercosur. Disponible en: <http://www.sice.oas.org/Trade/MRCSRS/Resolutions/RES4696.asp> Fecha de consulta: 28/05/2012.
 108. MERCOSUR (2005). Resoluciones del Grupo Mercado Común del Sur MERCOSUR/GMC/RES N° 16/05: Requisitos zoonosanitarios para el intercambio entre los estados partes de semen bovino y bubalino. Disponible en: <http://www.sice.oas.org/Trade/MRCSRS/Resolutions/res1605s.asp> Fecha de consulta: 28/05/2012.
 109. Morrow, D.A. (1986) *Current. Therapy in Theriogenology diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*. Philadelphia, Saunders. pp.132-136.
 110. Mortimer, S.T. (2000) CASA: practical aspects. *Journal of Andrology* 21:515-524.
 111. Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; Anton, N.M. (2002) Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology* 57:1695-1706.
 112. Müller, K.; Pomorski, T.; Müller, P.; Herrmann, A. (1999) Stability of transbilayer phospho-lipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *Journal Cell Science* 112:11-20.
 113. Nagase H., Niwa (1964) Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. 5° International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. Trento. pp. 410-415.
 114. Nur, Z.; Dogan, I.; Soylu, M.K.; Ak, K. (2003) Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue de Medecine Veterinaire* 154(7):487-490.

115. O'Connor M.T.; Amann R.P.; Saacke R.G. (1981) Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with Standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *Journal of Animal Science* 53(5):1368-1376.
116. Oliveira, E.C. (2003) Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino. Dissertação Mestrado. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte. 61p.
117. Parkinson, T.J. (2001) Artificial Insemination. En: Noakes, D.E.; Parkinson T.J.; England G.C.; Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8ªed. London, Saunders. pp.751-778.
118. Parks, E.J.; Graham, J.K. (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membrans. *Theriogenology* 38:209-222.
119. Parrish J. J.; Krogenaes A.; Susko-Parrish J.L. (1995) Effects of bovine sperm separation by either swim-up or percoll methods on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44: 859-869.
120. Pérez-Llano, B.; García-Casado, P.; Lorenzo, J.; Sánchez-Sánchez, R. (1998) Response to the boar sperm to the Host test and relationship between HOST and ORT results. *Proceeding 15th Internacional Pig Veterinary Society Congress. Birmingham, England.* p.69.
121. Perez-Llano, B., Sanchez-Sanchez, R., Yenes, P., Garcia-Casado, P. (2001) Estudio de la evolución de poblaciones de espermatozoides de verraco según su respuesta al HOST corto y el estado del acrosoma durante la conservación a 15°C. 6th International Conference on Pig Reproduction. Missouri. p.50.
122. Perry, E. (1960) *The Artificial Insemination of Farm Animals.* 3ª ed. New Brunswick, Rutgers University Press. 430p.
123. Phillips, N.J.; Evans, G.; McGowan, M.R. (2004a) Measures used to assess frozen-thawed semen in Autralian livestock semen processing centers. *Australian Veterinary Journal* 82:309-310.
124. Phillips,N.J.; McGowan, M.R.; Johnston, S.D.;Mayer, D.G. (2004b) Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Autralian dairy AI sires. *Animal Reproduction Science* 81:47-46.
125. Pickett, B.W.; Berndtson, W.E. (1978) Principios y técnicas de la congelación de los espermatozoides. En: Salisbury, G.W.; VanDemark N.L.; Lodge, J.R. *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en bóvidos.* 2º ed. Zaragoza, Acribia. pp.518-580.
126. Pinkel,D.; Garner D.L.; Gledhill, B.L.; Lake S, Stephenson D., Johnson L.A. (1985) Flow cytometric determination of the proportions of X and Y chromosome bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *Journal of Animal Science* 60: 1303-1307.
127. Prathalingam, N.; Holt, W.; Revell, S.; Jones, S.; Watson, P. (2005) Dilution of spermatozoa results in improved viability following a 24h storage period but

- decreased acrosome integrity following cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 91:11-22.
128. Purdy, P.H. (2006) A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63: 215-225.
 129. Rao, A.R. (1971) Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis. Royal Veterinary College, Stockholm. 88p.
 130. Revell, S.G.; Mrode, R.A. (1994) An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science* 36(1):77-86.
 131. Ritar, A.J.; Ball, P.D.; O'May, P.J. (1990) Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development* 2:27-34.
 132. Roberts, S.J. (1979) *Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción*. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 1079p.
 133. Rodríguez-Martínez, H. (2006) Can we increase the estimative value of semen assessment? *Animal Reproduction Domestic* 41:2-10.
 134. Rodríguez- Martínez H, (2005) Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. Brazilian Congress of Animal Reproduction, 16 Goiania, Brazil. Proceedings. Goiania: CBRA, pp.1-8.
 135. Rodríguez-Martínez, H. (2000) Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. En: Topics in bull fertility. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/Repro_Chenoweth/Rodriguez_Martinez/chapter.a.sp?LA=1 Fecha de consulta: 12/9/2012.
 136. Rodríguez-Martínez, H. (1999) Nuevas tecnicas de evualuación de la fertilidad en el macho. 2º Congreso Ibérico de Reproducción Animal pp.302-316.
 137. Rodríguez-Martínez, H.; Larsson, B.;Perstoft, H. (1997) Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, Fertility and Development* 9:297-308.
 138. Rota, A.; Penzo, N; Vicenti, L.; Mantovani, R. (2000) Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 53:1415-1420.
 139. Rubio-Guillén, J.L.; Quintero, A.A.; González, D.M. (2009) Effect of cryopreservation on integrity of plasmatic and acrosomal membrane of bulls sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 19(4):382-389.
 140. Saacke, R.G. (2008) Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 70(3): 473–478.
 141. Saacke, R.G.; Nadir, S.; Nebel, R.L. (1994) Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 41:45-50.

142. Saacke, R.G.; DeJarnette, J.M.; Nebel, R.L.; Nadir, S. (1991) Assessing bull fertility. Proceeding Annual Meeting Society for Theriogenology, San Diego, California. Society for Theriogenology, Hastings, NE. pp.56-69.
143. Saacke R.G.; White, J.M. (1972) Semen quality tests and their relationship to fertility. Proceeding. 4to Technical Conference National Association Animal Breeders (NAAB). Columbia. pp. 22-27.
144. Saacke, R.G. (1970) Morphology of the sperm and its relationship to fertility. Proceedings 3er Technical Conference National Association Animal Breeders (NAAB). Madison, Wisconsin. pp. 21-30.
145. Saeki K.; Nagao Y.; Hoshi M.; Nagai M. (1995) Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 43: 751-759.
146. Salisbury G.W., VanDemark N.L.; Lodge J.R. (1978) *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos*, 2º ed. Zaragoza Acribia, 831p.
147. Sánchez-Partida, L.G.; Setchell, B.P.; Maxwell, W.M. (1997) Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 9:689-696.
148. Santos, G.C. (2003) Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais. 58p.
149. Seidel, G.E. (1996) Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Proceedings. Fort Collins: Colorado State University pp.6-16.
150. Shamsuddin, M.; Larsson, B. (1993) In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reproduction in Domestic Animals* 28:77-84.
151. Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R. (1999) The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Human Reproduction* 14:2801-2807.
152. Sikka, S.C. (2004) Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology* 25:5-18.
153. Sinha, M.P.; Sinha, A.K.; Sing, B.K.; Prasad, R.L. (1996) The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science* 41:237-243.
154. Söderquist, L.; Jansson. L.; Larsson. K.; Einarsson, S. (1991) Sperm morphology and fertility in AI bulls. *Journal of Veterinary Medicine* 38:534-543.
155. Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; McCue, P.M.; Bruemmer, J. (1999) Cooled and frozen Stallion Semen. 9º *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin*, 80p.

156. Sullivan J.J. (1978) Morfología y motilidad de los espermatozoides. En Salisbury G.W., Van Demark N.L., Lodge J.R. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en bóvidos, 2^oed. Zaragoza, Acribia. 831p
157. Tribulo, H.E.; Alonso, N.; Bó, G.A.; Brogliatti, G.M.; Caccia, M.; Carcedo, J.; Tribulo, R. (2002) Actualización sobre fisiología reproductiva y evaluación de la capacidad reproductiva del toro. Cordoba, Mariana Caccia, 225 p.
158. Valença, R.M.; Guerra, M.M. (2007) Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. Revista Brasileira de Reprodução Animal 31(1):47-53.
159. Vera, O. (2003) Evaluación seminal comparativa pre y post congelación en machos bovinos. En: González-Stagnaro, C. Reproducción Bovina. Maracaibo. Fundación Giraz. pp.251-262.
160. Verstegen, J.; Iguer- Ouada, M.; Oclin, K. (2002) Computer assisted semen analyzers in andrology research an veterinary practice. Theriogenology 57:149-179.
161. Vianna, F.P.; Papa, F.O.; Zahn, F.S.; Melo, C.M.; Dell'Aqua Junior, J.A. (2009) Termoresistance sperm test are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. Animal Reproduction Science 113:279-282.
162. Vishwanath, R., Shannon, P. (2000) Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Animals Reproduction Science 62:23-53.
163. Ward, F.; Enright, B.; Boland, M.P.; Lonergan, P. (2002) Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. Theriogenology 57:2105-2117.
164. Watson, P.F. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. Reproduction, Fertility and Development 7:871-891.
165. Watson, P.F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 60:481-492.
166. White, D.R.; Aitken, R.J. (1989) Relationship between calcium, cyclie AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. Gamete Research 22:163-177.
167. Wilhelm, K.M.; Graham, J.K.; Squires, E.L. (1996) Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. Cryobiology 33:320-329.
168. Woelders, H. (1991) Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. Hamburg. Reproduction in Domestic Animals pp142-144.
169. Wolfe, C., James, P., Mackie, A., Ladha, S., Jones, R. (1998) Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. Biology of Reproduction 59:1506-1514.

170. Yildiz, C.; Kaya, A.; Aksoy, M.; Tekeli, T. (2000) Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54:579-585.
171. Zavos, P.M.; Correa, J.R.; Zarmakoupis, P.N. (1996) Measurement of the sperm motility index via the sperm quality analyzer and its relationship to other qualitative sperm parameters. *Theriogenology* 46:421-427.
172. Zhang, B.; Larsson, B.; Rodriguez-Martinez, H. (1995) Results of an intact zona pellucida binding assay and in vitro fertilization, using semen from bulls with high or low fertility after AI. *Proceeding. 11th Annual Meeting European Embryo Transfer Association, Hannover. Abstract. p.262.*
173. Zini, A.; Garrels, K.; Phang, D. (2000) Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology* 55(6):922-926.

ANEXO I

Marco legal

Si bien a nivel nacional no existe reglamentación, en la región la comercialización de semen se basa en las resoluciones del Mercosur.

Para comercializar dentro de éste, hay que estar registrado y habilitado, como Centros de colecta y procesamiento de semen de toros, por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) a través de la Sección Reproducción de la Dirección de Laboratorios Veterinarios DILAVE "Miguel C. Rubino"

A continuación se amplía la reglamentación antes mencionada:

A) Marco regulatorio para el tratamiento de la genética animal de bovinos, caprinos, ovinos, équidos y porcinos en el MERCOSUR

Estándares biotecnológicos mínimos para la comercialización de material seminal en el ámbito del 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) Numero 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%.

B) Requisitos zosanitarios para el intercambio entre los estados partes de semen bovino y bubalino

SOBRE EL ESTADO PARTE DE ORIGEN:

Artículo 21.- El Estado Parte exportador deberá estar libre de Peste Bovina, Pleuroneumonía Contagiosa Bovina, Dermatitis Nodular Contagiosa y Fiebre del Valle del Rift, de acuerdo con lo establecido en el Código Sanitario de los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Artículo 22.- El Estado Parte libre de Fiebre Aftosa con o sin vacunación, en todo su territorio o en una región del mismo, reconocido por la OIE o por el Estado Parte importador, certificará esta condición.

El Estado Parte exportador, que no sea libre de Fiebre Aftosa, en todo su territorio o en una región del mismo, podrá acordar con el Estado Parte importador garantías adicionales compatibles con las recomendaciones del Código Sanitario de los Animales Terrestres de la OIE.

LOS ANIMALES

Artículo 23.- Sólo podrán ingresar al CCPS animales nacidos y criados ininterrumpidamente en el Estado Parte exportador, o animales que hayan ingresado al Estado Parte exportador cumpliendo lo establecido en las normas del MERCOSUR relativas a los requisitos zoonosanitarios para el intercambio de bovinos y bubalinos. En este caso, deberán haber permanecido en el Estado Parte exportador como mínimo 60 (sesenta) días antes de la fecha de la primera colecta.

Los animales importados desde terceros Estados deberán haber permanecido en el Estado Parte exportador como mínimo 60 (sesenta) días antes de la fecha de la primera colecta.

Artículo 24.- El CCPS deberá comunicar inmediatamente al Servicio Veterinario Oficial del respectivo Estado Parte las bajas de todo animal, informando el motivo de la baja, el número de registro del animal, el número de dosis de semen en existencia y la fecha de colecta.

Todo animal bajo sospecha de enfermedad infecciosa transmisible por el semen deberá ser aislado. El hecho deberá ser comunicado inmediatamente al Servicio Veterinario Oficial. Las dosis de semen del referido animal, no podrán ser comercializadas hasta la confirmación de su diagnóstico por un Laboratorio Oficial. El destino del semen almacenado será determinado por el Servicio Veterinario Oficial.

Artículo 25.- Los animales residentes, que por cualquier motivo salieran del CCPS, deberán cumplir con la cuarentena de ingreso para reingresar al mismo.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

Artículo 26.- Además de las pruebas mencionadas en la presente Resolución, podrán ser acordados, entre el Estado Parte importador y el Estado Parte exportador, otros procedimientos y pruebas de diagnóstico que presenten garantías equivalentes para el intercambio de semen bovino y bubalino.

PROCEDIMIENTOS ZOOSANITARIOS PREVIOS AL INGRESO A LA CUARENTENA

Artículo 27.- Para ingresar al CCPS los animales deberán estar acompañados de un certificado zoonosanitario, expedido por el Veterinario Oficial o responsable del CCPS, donde conste que en el establecimiento de origen no hubo ocurrencia de enfermedades transmisibles por el semen que afecten a la especie en los últimos 90 (noventa) días y que las pruebas de diagnóstico realizadas a los animales obtuvieran resultados negativos para las siguientes enfermedades:

a. TUBERCULOSIS - Prueba intradérmica simple con PPD bovina o comparada con PPD bovina y aviar.

b. BRUCELOSIS – Antígeno Acidificado Tamponado (BBAT/BPA) / Rosa de Bengala. Los animales positivos serán sometidos a Fijación de Complemento (FC) o 2-mercaptoetanol o Test de ELISA.

PROCEDIMIENTOS ZOOSANITARIOS EN LA CUARENTENA

Artículo 28.- Con respecto a la Estomatitis Vesicular los animales que ingresen al centro deberán cumplir con lo establecido en los capítulos correspondientes del Código Sanitario de los Animales Terrestres de la OIE.

Artículo 29.- Los animales deberán ser mantenidos en cuarentena durante un período mínimo de treinta (30) días, pudiendo ingresar al rebaño residente después de haber obtenido resultado negativo a las siguientes pruebas:

1. BRUCELOSIS – Antígeno Acidificado Tamponado (BBAT/BPA) / Rosa de Bengala. Los animales positivos serán sometidos a Fijación de Complemento (FC) o 2-mercaptoetanol o Test de ELISA.

2. TUBERCULOSIS: prueba intradérmica simple con PPD bovina o comparada con PPD bovina y aviar. Esta prueba solamente podrá ser realizada después de los 60 (sesenta) días de la última prueba realizada.

3. CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA: 4 (cuatro) pruebas negativas de cultivo de material prepucial, realizadas a intervalos de 7 (siete) días, o una prueba de inmunofluorescencia.

4. TRICHOMONIASIS: 4 (cuatro) pruebas negativas de cultivo de material prepucial, realizadas a intervalos de 7 (siete) días.

5. DIARREA VIRAL BOVINA (BVD): prueba de aislamiento e identificación por técnica de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa en muestras de sangre total. Se realizarán 2 (dos) pruebas. Si la primera arroja resultado positivo se repetirá la prueba con un intervalo mínimo de 14 (catorce) días. Si el resultado de la segunda prueba fuera negativo dicho animal será autorizado para ingresar al CCPS.

PROCEDIMIENTOS ZOOSANITARIOS PARA EL RODEO RESIDENTE

Artículo 30.- Los animales residentes serán sometidos a pruebas de diagnóstico cada 180 (ciento ochenta) días, que deberán presentar resultado negativo, a las siguientes enfermedades:

1. BRUCELOSIS – Antígeno Acidificado Tamponado (BBAT/BPA) / Rosa de Bengala. Los animales positivos serán sometidos a Fijación de Complemento (FC) o 2-mercaptoetanol o Test de ELISA.

2. TUBERCULOSIS: prueba intradérmica simple con PPD bovina o comparada con PPD bovina y aviar.

3. CAMPILOBACTERIOSIS GENITAL BOVINA: un cultivo de material prepucial o una prueba de inmunofluorescencia (IF).

4. TRICOMONIASIS: un cultivo de material prepucial.

Artículo 31.- Los animales residentes, cuyo semen va a ser destinado a exportación, serán sometidos además a pruebas de diagnóstico que deberán presentar resultado negativo a las siguientes enfermedades:

a. RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR): prueba de seroneutralización o Test de ELISA realizada como mínimo 21 (veintiún) días después de la colecta; o someter una muestra de 0,5 ml de semen procesado de cada partida a una prueba de aislamiento viral o prueba de PCR.

b. LENGUA AZUL (LA): una prueba de inmunodifusión en gel de agar o Test de ELISA, realizada 40 (cuarenta) días después de la última colecta; o muestras de sangre total del animal dador colectadas cada 14 (catorce) días sometidas al test de aislamiento viral en huevos embrionados o a la prueba de PCR de semen, o someter una muestra de 0,5 ml de semen procesado de cada partida a una prueba de PCR.

c. LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA (LBE): prueba de inmunodifusión en gel de agar o Test de ELISA en una muestra de suero obtenida como mínimo 30 (treinta) días después de la última colecta de semen; o someter una muestra de 0,5 ml de semen procesado de cada partida a una prueba de PCR.

d. DIARREA VIRAL BOVINA (DVB): se exige prueba de ELISA captura de antígenos.

Artículo 32.- Los animales residentes que obtuvieran resultados positivos para las enfermedades mencionadas en este capítulo, deberán ser aislados y reevaluados por el Servicio Veterinario Oficial del respectivo Estado Parte, que determinará el destino de los animales.

Artículo 33.- No será necesaria la realización de las pruebas de diagnóstico correspondiente a las enfermedades mencionadas en el artículo 31, cuando el Estado Parte exportador se encuentre libre de alguna de ellas, en todo su territorio o en una región del mismo, en virtud de un reconocimiento de la OIE o del Estado Parte importador.

En este caso, el Estado Parte exportador deberá certificar dicha condición y además que el CCPS cuenta con certificación oficial de establecimiento libre, emitido por el Servicio Veterinario Oficial del Estado Parte respectivo, en el marco de un programa nacional de erradicación.

SEMEN

Artículo 34.- El semen deberá ser colectado y procesado de acuerdo a lo establecido en el Código Sanitario de los Animales Terrestres de la OIE.

Artículo 35.- El semen será almacenado por un período de 45 (cuarenta y cinco) días a partir de la colecta en las instalaciones del CCPS.

Artículo 36.- Para el intercambio entre los Estados Partes, el semen bovino y bubalino deberá estar acompañado del “Certificado Zoosanitario para el intercambio entre los Estados Partes de semen bovino y bubalino”, conforme al modelo que consta como anexo II de la presente Resolución.

Dicho certificado deberá estar firmado por el Veterinario responsable del CCPS y refrendado por el Veterinario del Servicio Oficial del Estado Parte exportador.

Todas las hojas del certificado deberán estar numeradas secuencialmente, sellada y rubricadas por el Veterinario del Servicio Oficial del Estado Parte exportador.

ANEXO II

Encuesta a LABORATORIOS DE PROCESAMIENTO DE SEMEN (LPS) BOVINO EN URUGUAY

En caso que se pregunte sobre algo que usted no realiza, puede optar según crea conveniente por responder con un NO o simplemente no lo conteste. En caso de querer realizar observaciones o especificaciones sobre algún punto, siéntase libre de hacerlo donde lo crea conveniente.

1) Sobre la colecta

- a) Régimen de colecta ¿Cuántos días por semana y saltos por día se realizan?
- b) ¿Método de colecta más frecuente?: Ej. vagina artificial, electroeyaculador o masaje rectal.

2) Evaluación del semen fresco

Contestar en caso que se haga extracción de toros donantes y se realicen pruebas sobre el semen previo a la congelación. Si quiere realizar observaciones o especificaciones sobre algún punto, siéntase libre de hacerlo donde lo crea conveniente.

- a) ¿Cuáles de las siguientes pruebas macroscópicas realiza y sobre éstas que parámetros considera aceptable? (Especificar escala utilizada)

- € Volumen: _____
- € Color: _____
- € Densidad: _____
- € Motilidad en masa: _____
- € pH: _____
- € Cuerpos extraños: _____
- € Schalm test (CMT): _____

- b) Sobre las siguientes pruebas microscópicas, ¿en caso de realizarlas que valor o porcentaje según el caso considera aceptable para congelar? (Especificar escala utilizada)

€ Motilidad en masa microscópica:
Valor / % mínimo aceptado para congelación: _____

€ Motilidad individual:
Valor / % mínimo aceptado para congelación: _____

¿Cual/es diluyentes utiliza? _____

¿Cuál es la metodología empleada? (ej.: Microscopio óptico, Fotomicrografía o Videomicrografía, Contraste de fase, CASA): _____

€ Vigor:
Valor / % mínimo aceptado para congelación: _____

€ Concentración:
Valor / % mínimo aceptado para congelación: _____
¿Cuál es la metodología empleada? (ej.: Hematocitómetro, Colorímetro, Espectrofotómetro o CASA): _____

€ Coloración post vital:
Valor / % mínimo aceptado para congelación: _____
¿Cuál es la tinción que utilizan? (ej.: Eosina-nigrosina o Fluorocromos): _____

€ Morfología:
Valor / % mínimo aceptado para congelación: _____
¿Cuál es la metodología empleada? (ej.: Giemsa, Contraste fase, Tinción vital o Glutaraldehído): _____

€ Integridad del Acrosoma:
Valor / % mínimo de acrosoma aceptado para congelación: _____
¿Cuál es la metodología empleada?: _____

€ Otras pruebas sobre semen fresco? ¿Cuáles?: _____
Valor / % mínimo aceptado para congelación: _____

3) Evaluación del semen al descongelado

En caso de querer realizar observaciones o especificaciones sobre algún punto, siéntase libre de hacerlo donde lo crea conveniente.

Pruebas microscópicas:

€ Test de termorresistencia:
Temperatura: _____
Tiempo: _____
Valor / % mínimo aceptado para la prueba de morfología aplicando el tiempo y temperatura indicados: _____

€ Motilidad individual:
Valor / % mínimo aceptado: _____
¿Cuál es la metodología empleada? (ej.: Citrato de Na, suero fisiológico, fotomicrografía, videomicrografía, espectrofotometría o CASA): _____

€ Vigor:
Valor / % mínimo aceptable: _____

€ Morfología:
¿Cuál es el sistema que utiliza para clasificar las malformaciones?: _____
Valor / % máximo aceptable de spz anormales: _____
Valor / % máximo de acrosomas alterados: _____

€ Concentración:
Valor / % mínimo aceptado: _____
¿Cuál es la metodología empleada? (ej.: Hematocitómetro, colorímetro o espectrofotómetro): _____

€ Test de integridad de membrana:
¿Cuál es la metodología empleada? (ej.: Test de resistencia osmótica): _____

€ Otras pruebas sobre semen congelado ¿Cuáles?: _____
Valor / % mínimo aceptado para utilización: _____

€ ¿Evalúan rutinariamente todas las partidas congeladas?

4) A futuro

a) ¿Considera que hay necesidad de estandarizar las pruebas de evaluación de la calidad de semen fresco y congelado?

b) ¿Tiene pensado incorporar a futuro, alguna técnica o equipo para evaluar el semen?