



Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino

Milangela Morillo
Saúl Salazar
Enayarix Castillo

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas es un instituto autónomo, creado de acuerdo a la Gaceta Oficial N° 36.920 del 28 de marzo de 2000, adscrito al Ministerio de Agricultura y Tierras por decreto N° 5.379 de Gaceta Oficial N° 38.706 del 15 de Junio de 2007.

De acuerdo con el Reglamento de Publicaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, aprobado por la Junta directiva en su sesión N° 126, según resolución N° 1456 de fecha 18 de febrero de 2010, esta es una Publicación Divulgativa.

Publicaciones Divulgativas: contienen información sobre datos comprobados y actualizados de investigación, los cuales tienen aplicación práctica por parte de los productores agrícolas. Son escritos por investigadores, técnicos y especialistas en comunicación y dirigidos a los productores agrícolas. Están redactados de manera sucinta y sencilla, utilizando en lo posible los términos de uso común por los productores a quienes van dirigidos. Este tipo de publicaciones comprende, preferentemente, la información útil y completa para cada una de las fases de un cultivo (preparación del terreno, variedades, épocas de siembra, riego, fertilización...) o bien sobre el manejo y cuidado de animales (destete, crianza, alimentación, vacunación, desparasitación y otros). También procedimientos acerca de la toma de muestras de suelo, plantas, aguas, entre otros, por parte de los productores. Adoptan la forma de revistas, hojas, desplegables, cartas circulares y folletos.

Morillo, M; Salazar, S; Castillo, E. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 60 p.



INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS
CENTRO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino

Milangela Morillo*
Saúl Salazar*
Enayarix Castillo*

*INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay. Venezuela.

PUBLICACIÓN DIVULGATIVA

© Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas – INIA, 2012

Edif. Gerencia General del INIA
Av. Universidad, vía El Limón, Maracay, Aragua, Venezuela.
Teléfonos: (58) 243 2404779
Apartado postal 2103
<http://www.inia.gob.ve>

Coordinación editorial: **Elio A. Pérez S.**

Diseño y Diagramación: **Raquel González**

Fotos Tapa: **Adriana de Trizio. Revista Produccion y Negocio**

Impresión y encuadernación: **Taller de Artes Gráficas del INIA**

Hecho el Depósito de Ley

Versión impresa
Depósito Legal: If2232012630375
ISBN 978-980-318-271-7

Versión Digital
Depósito Legal: Ifi2232012630376
ISBN 978-980-318-278-6

Esta obra digital es propiedad del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, publicado para el beneficio y la formación plena de la sociedad. Por ello se permite el uso y la reproducción total o parcial del mismo, siempre que no se haga con fines de lucro, se cite al autor y la institución conforme a las normas vigentes.

Contenido

Introducción	5
Historia del animal	9
Evaluación del estado de salud general de animal	11
Evaluación del los órganos genitales externos	14
Evaluación de los órganos genitales internos	20
Evaluación funcional de la libido y prueba de capacidad de servicio	22
Recolección de semen en el bovino	23
Evaluación de semen de bovino	30
Dilución y congelación de semen de bovino	45
Evaluación de semen congelado	50
Consideraciones generales	57
Bibliografía consultada	59

Introducción

En años recientes se ha venido incrementado el uso de las biotecnologías reproductivas en el país. Su utilización consolida el desarrollo de la actividad agropecuaria, para así buscar un aumento de la productividad del rebaño nacional que permita ofrecer más carne y leche de calidad a la población venezolana. Todo lo anterior con el fin de afianzarse en el camino hacia la soberanía agroalimentaria de la nación.

Entre las biotecnologías reproductivas más utilizadas se destacan la inseminación artificial y el trasplante de embriones, las cuales consisten en depositar semen o embriones viables en una vaca receptora sincronizada para tal fin, la cual es realizada por un profesional entrenado en las técnicas. Entre las limitantes de estas biotecnologías reproductivas, se puede mencionar una que se constituye en un factor determinante para el éxito de las mismas, como es la calidad del semen utilizado en ambas técnicas.

La ganadería de doble propósito es una importante industria nacional, siendo esta una fuente de ingresos significativa para el mercado pecuario venezolano. Este tipo de ganadería está llamada a satisfacer el incremento del consumo local de carne y leche, siendo este un sector del cual cada vez más depende económicamente gran cantidad de venezolanos. Esta condición exige que el sector maximice la eficiencia de su sistema de producción de doble propósito, para lo cual se requiere no sólo producir de una forma sostenible, sino también basar sus metas en

objetivos claros y precisos que permitan aprovechar al máximo estos recursos.

La eficiencia productiva de la ganadería de doble propósito es fundamental para maximizar la utilización de los recursos de dicho sector y así poder obtener el máximo provecho posible, el estudio de los factores que afectan su rendimiento es crucial. En este sentido, el papel que juega la fertilidad potencial del macho en la eficiencia reproductiva y productiva de las explotaciones bovinas es de incuestionable importancia para los sistemas de producción pecuarios. La anterior afirmación es fácilmente comprensible, debido a la existencia de un alto número de hembras en las explotaciones bovinas venezolanas, lo que provoca que la permanencia de machos subfétil o infértiles en las fincas, generando grandes pérdidas económicas a los productores.

No obstante, dada la importancia del macho dentro del sistema de producción pecuario, en los países tropicales ha sido poco estudiado, donde se calcula que sólo 20% de las publicaciones generadas sobre temas relacionados con la reproducción animal, se dedican a estudiar aspectos relacionados con el macho.

Para el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal del INIA-Ceniap, uno de los factores primordiales en la evaluación del potencial reproductivo del macho bovino es la calidad del semen y esta depende de tres factores fundamentales:

Animal: como son las patologías sistémicas y del aparato reproductor, alimentación, alojamiento, estrés y manejo.

Ambiente: como son la temperatura, la humedad, la radiación solar, entre otros.

Manejo del semen: como son la recolección, la evaluación, el proceso de congelación y descongelación.

Todos estos elementos por si solos pueden afectar gravemente la calidad del semen interfiriendo significativamente con los objetivos de la práctica de la Inseminación Artificial y el Trasplante de Embriones.

En el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal se recomienda hacer una evaluación del potencial reproductivo de los machos reproductores que serán utilizados en un régimen de monta natural o centros para la congelación de semen para la Inseminación Artificial (IA) y así seleccionar a aquellos animales que resulten satisfactorios en dicha evaluación, la cual consiste en valorar varios aspecto reproductivos del toro, como la actitud reproductiva, el estado de los órganos genitales internos y externos, y la calidad del semen pre y poscongelación.

Luego de realizar este análisis se puede garantizar el potencial reproductivo de los animales seleccionados y predecir su comportamiento dentro de los programas de reproducción en las unidades productivas. La evaluación del potencial reproductivo del toro o evaluación Andrológica consiste entonces, en la realización de diferentes pruebas diagnósticas que permitan predecir el potencial de fertilidad de un toro. Estas pruebas determinan la condición física, tamaño testicular, calidad del semen, libido y habilidad para la monta.

La evaluación reproductiva del macho se debe realizar entre los 30 a 60 días de antelación a la temporada de monta, exposiciones de ferias, venta del animal o extracción de semen. Este examen debe cumplir con los estándares señalados por la Sociedad Americana de Theriogenologia en esta materia (Sport, Thrift y Carpenter, 1998; Barham y Pennington, 2006) y consiste de una serie de pasos que se deben realizar de forma rutinaria y sistemática a estos fines.

Historia del animal

La historia del toro debe incluir nombre, raza, fecha de nacimiento, peso actual, controles previos de crecimiento, edad, fechas de las últimas desparasitaciones y vacunaciones, fecha de las últimas pruebas diagnósticas de enfermedades de transmisión sexual y resultados, fecha de tratamientos médicos. Se debe incluir también información reproductiva relativa al animal, como:

- Edad al primer servicio, este dato es importante en el diagnóstico de infertilidad de animales jóvenes.
- Tipo de apareamiento utilizado, debido a que se presenta algunas veces la relación macho – hembra, que no es la adecuada o si la monta es controlada, es posible que se le retire la hembra de la zona de servicio antes de que el toro se pueda excitar y eyacular, lo que compromete la eficiencia del macho.
- Número de servicio por vaca preñada. Se indica que lo ideal es menos de dos servicios, cabe destacar que, en este caso, hay que conocer la información de las vacas que se le ofrecen al toro, debido a que hay vacas problemáticas, las cuales requieren hasta de 10 servicios para quedar preñada, pudiendo ser en este caso por problemas no atribuibles al toro.

- Presencia de descargas por el pene (pus, sangre, líquido), antes de iniciar el servicio o en forma continua, lo que es indicativo de procesos inflamatorios, debido a una enfermedad infecciosa o traumatismo sufrido por el animal. Igualmente, se deberá registrar cualquier otra información que se requiera al momento de realizar la evaluación.

Evaluación del estado de salud general del animal

En la evaluación del estado general de salud del animal, se debe realizar una inspección del estado físico del animal en pie, en reposo y en movimiento, haciendo hincapié en:

Apariencia masculina: los machos poseen características típicas de su sexo, como son la musculatura, el comportamiento agresivo y decidido y el desarrollo de los órganos sexuales. La esencia de estas características está relacionada directamente con los niveles de testosterona.

Condición corporal: debe ser óptima, grado tres en una escala de uno al cinco, machos mal alimentados o con sobrepeso pueden tener lesiones irreversibles en los testículos, en caso de toretes jóvenes la pubertad se vería atrasada. Se recomienda no seleccionar machos con mal estado físico y pobre condición corporal, debido a que se presentan problemas de fertilidad (Chayer y Pasqualini, 2009).

Piel: se debe observar la piel del animal buscando la presencia de ectoparásitos, lesiones causadas por hongos, heridas o cicatrices que pudieran haber afectado o estar afectando la salud y el confort actual del toro. Los ectoparásitos causan anemia y los hongos heridas que muchas veces se contaminan y cursan con dolor y escozor; ambas provocan en el animal inquietud, pérdida de peso, desánimo y pérdida del apetito sexual.

Boca: se debe inspeccionar el morro, los labios, los dientes, la lengua, el paladar y los carrillos. Al momento de la masticación se debe observar la presencia o no de braquignatia o prognatía. Los dientes deben estar completos y sanos. Si el animal saliva mucho, pudiera esto ser ocasionado por una herida en la zona de los elementos anteriormente mencionados, por lo cual, animales con lesiones en esas áreas no podrán comer bien, perderán peso y su comportamiento sexual se verá afectado.

Ojos: el sistema ocular debe ser inspeccionado para descartar la presencia de patologías, como queratitis, conjuntivitis, papilomas, carcinomas, úlceras corneales, entre otras, debido a que limitan la observación y búsqueda de hembras en celo, alimentación, entre otras. Esto comprometería la eficiencia reproductiva del toro.

Patas y pezuñas: en el macho el sistema locomotor, especialmente, las articulaciones y los músculos de los miembros posteriores y de la espalda requieren de una atención especial. Cuando el toro monta, todo su peso recae en las patas traseras, participando la articulación sacroilíaca en el soporte del peso. Balancear todo el peso sobre los miembros posteriores provoca una rápida y fuerte contracción sobre los huesos, articulaciones y músculos de esa región. Cualquier alteración o anomalía en esa zona podría conducir a la negación de la monta temporal o definitiva por parte del toro.

Hay que tomar en cuenta que los animales, que se encuentran exclusivamente en pastoreo, deben mantener las patas y pezuñas en excelentes condiciones, debido a las largas distancias que deben recorrer en busca de alimento y hembras en celo. La mejor forma de evaluar patas y pezuñas es observando al animal mientras se desplaza, debido a que es cuando se hacen más notables las cojeras, incoordinaciones y desviaciones de la postura normal.

Luego se debe realizar una inspección minuciosa de la zona mientras esta inmobilizado en el brete de colección. Los defectos de aplomos presionan las articulaciones causando dolor e incapacidad para montar. La pezuña es un sitio común de lesiones que causan cojera; esta se debe examinar para determinar si hay úlceras, heridas penetrantes, callos, abscesos y crecimiento anormal. Los machos con problemas de pezuña a menudo muestran deficiencia en la libido.

Evaluación de los órganos genitales externos

Los genitales externos se pueden evaluar por inspección y palpación, mientras que los internos solo pueden ser examinados por palpación rectal. El toro debe ser inmovilizado en un brete para facilitar su evaluación y debe ser tratado con paciencia y firmeza, pero suavemente, evitando lesionarlo.

Pene y prepucio: el pene es el órgano copulador del macho y se le debe realizar una evaluación anatómica y funcional, en la evaluación anatómica se debe identificar heridas, traumas o inflamaciones. En la funcional se deberá prestar atención a los mecanismos de exteriorización, erección y reintroducción del pene, mucosa y patologías. Se han señalado algunas anomalías en el pene que son motivo de descalificación, como hipoplasia del glande, duplicación parcial o total del pene, ausencia total de la flexura sigmoidea, persistencia del frenillo, entre otras.

En los becerros el pene se encuentra adosado al prepucio e inicia su desprendimiento al momento en que los testículos comienzan a hacerse funcionales, de manera que es común observar el frenillo del pene en los machos jóvenes en períodos peripuberales.

El prepucio se examina en el momento en que se realiza la evaluación del pene; debe ser siempre observado para des-

cartar la presencia de adherencias, heridas o hematomas aumento de temperatura, aumento de tamaño, deformaciones y secreciones. La mucosa en caso de prolapso prepucial y la evaluación del orificio prepucial se realiza introduciendo tres dedos para descartar estenosis, fimosis y otras lesiones. Los toros *Bos indicus* (cebú y acebuados) son más propensos a sufrir lesiones, debido a que tienen un prepucio muy péndulo.

Escroto: la inspección del escroto revela información sobre el estado de los testículos. El escroto debe ser simétrico, la asimetría a menudo refleja diferencias en el tamaño testicular. Se observará la piel buscando que esté libre de lesiones, heridas, cicatrices, adherencia, calor y sensibilidad que pudieran comprometer la salud de los testículos. Tanto los animales *Bos indicus* (cebú y sus cruces), como los *Bos taurus* (razas europeas), presentan mecanismos de adaptación al medio ambiente tropical, el cual se caracteriza por poseer escrotos muy péndulos, haciéndolos propensos a tener lesiones por traumatismos.

Testículo: en los machos los testículos son los órganos genitales de mayor importancia porque es el sitio donde se originan los espermatozoides. En ellos se produce la testosterona, importante para la espermatogénesis, comportamiento sexual, crecimiento genital y corporal. El testículo es de forma ovoide, turgente y elástico. Cuando el testículo presenta una consistencia dura o fibrotica indica que existieron procesos inflamatorios, mientras que una consistencia muy blanda señala una alteración en el curso de la espermatogénesis.

Animales con problemas de descenso de uno (unilateral) o ambos (bilateral) testículos son llamados criptorquídicos, estos animales deberán ser eliminados del rebaño por ser este un factor hereditario transmisible a la descendencia. Los machos que tengan testículos asimétricos deben ser vistos con sospecha de una hipoplasia o degeneración testicular.

En el caso de ser un animal adulto es posible que se trate de una degeneración testicular, esta presunción puede corroborarse al realizar la evaluación seminal. A través de esta evaluación es posible diagnosticar con certeza el problema y así poder aplicar los correctivos necesarios. Si se trata de un animal joven, con una edad comprendida entre ocho y 12 meses, entonces, el diagnóstico de hipoplasia de uno o ambos testículos es el correcto.

Epidídimos: la evaluación de los epidídimos se debe hacer por palpación al momento de realizar el examen de los testículos. El epidídimo es el lugar donde se almacenan los espermatozoides producidos por los testículos; igualmente, es el lugar donde maduran los espermatozoides y adquieren la capacidad potencial para fertilizar. El órgano está adosado en cada testículo y anatómicamente consta de tres porciones: cabeza, cuerpo y cola.

La cabeza del epidídimo se encuentra en el polo superior del testículo y se debe evaluar su forma, simetría y consistencia (tenso-firme-elástica). Seguidamente se continúa con el cuerpo del epidídimo, el cual se sitúa en la cara dorso lateral medial de la glándula y se palpa como una banda de un centímetro de ancho aproximadamente, al cual se le evalúa su ubicación, tamaño, forma y consistencia. La evaluación del epidídimo termina en la cola, porción que tiene forma cónica y una amplitud aproximada en su base de dos a tres centímetros, la consistencia de la cola es normalmente firme y su abultamiento dependerá de su repleción con espermatozoides.

Aquellos animales recién colectados o en servicio pueden presentar a la palpación la porción de la cola menos firme y menos abultada. En cambio los machos reproductores que no producen espermatozoides o en los casos de oligospermia, la cola se presenta plana y a la palpación se sentirá blanda. Adicionalmente, se debe buscar en la palpación inflamaciones, engrosamientos, malformaciones, aplacías, entre otros.

Cordón espermático: es una estructura compuesta por vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, el músculo cremaster y el conducto deferente. Se ubica en el polo dorsal del testículo y se puede palpar cerca del canal inguinal. Su examen se debe realizar por palpación, debiéndose evaluar la simetría y su consistencia (tenso-firme-elástica). Hacia la cara medial se puede palpar el conducto deferente el cual tiene un diámetro aproximado de dos a tres milímetros.

Los hallazgos patológicos más comunes son: aplasia segmentaria de los conductos de Wolff, hernia inguinal y procesos inflamatorios de diversa etiología.

Circunferencia escrotal: se ha demostrado una alta correlación entre el peso de los testículos y la circunferencia escrotal, así como entre el peso de los testículos y la producción de espermatozoides, igualmente entre la circunferencia escrotal y la calidad de eyaculado. Por esta razón, al seleccionar toros con una circunferencia escrotal mayor, indirectamente, estamos seleccionando por producción de espermatozoides, esta característica tiene una heredabilidad alta de 0,65.

La medida de la circunferencia escrotal también permite determinar la edad de la pubertad y algunas patologías testiculares. Se ha señalado que los descendientes de toros con circunferencia escrotal alta, alcanzan la pubertad a edades más tempranas. La circunferencia escrotal se mide con una cinta metálica especial, la cual se debe colocar en el diámetro más ancho de los testículos, después de haberlos desplazado hacia el fondo del escroto (Figura 1).

Como guía para la selección de animales reproductores basados en su circunferencia escrotal, se pueden utilizar los requerimientos de la Sociedad Americana de Theriogenología, los cuales indican un mínimo 30 centímetros para animales *Bos taurus*,

con edades comprendidas entre 12 y 15 meses, y para animales *Bos indicus*, con edades comprendidas entre los 18 y 20 meses.

De igual manera, se puede considerar como mínimo 30 centímetros de circunferencia escrotal a los 15 meses y 34 centímetros a los 24 meses o más, respectivamente. Cuando se trabaja con animales doble propósito, entonces, se debe exigir por lo menos 30 centímetros a los 24 meses y no menos de 32 centímetros a los 36 meses o más.



Figura 1. Medición de la circunferencia escrotal en el bovino.

En el Cuadro 1 se resume los valores mínimos de circunferencia escrotal para toros, de acuerdo a los rangos de edad (meses) del animal.

Cuadro 1. Promedio de la circunferencia escrotal en toros, de acuerdo a los rangos de edad.

Edad (meses)	Centímetros (cm)
≤ 15	30
> 15 < 18	31
> 18 < 21	32
> 21 < 24	33
> 24	34

Fuente: Salisbury *et al.*, 1982

Evaluación de los órganos genitales internos

Los órganos genitales internos corresponde a las glándulas sexuales accesorias, el examen se realiza por palpación rectal. En el centro del piso de la cavidad pélvica se localiza la uretra pélvica; esta se siente como una estructura firme, cilíndrica y aplanada dorso ventralmente de tres a cuatro centímetros de diámetro aproximadamente.

En la parte anterior de la uretra pélvica se encuentra una elevación de perfil triangular, esta es la próstata, la cual es palpable sólo en la porción del cuerpo, ya que el resto de la glándula se encuentra diseminada entre los tejidos de los músculos que cubren la uretra pélvica (Figura 2).

Las glándulas vesiculares o vesículas seminales son pares, de forma lobulada y se pueden ubicar, colocando la mano, desde el extremo anterior de la uretra pélvica y realizando suaves movimiento laterales. Las dimensiones varían de acuerdo con la raza y edad del animal; son estructuras de aproximadamente 10 a 15 centímetros de largo y dos a tres centímetros de ancho.

En los toretes muy jóvenes las glándulas son poco lobuladas y su desarrollo es indicativo de la función testicular, debido a que todas las glándulas accesorias son andrógeno-dependientes.

La lesión más común encontrada en las glándulas vesiculares es la inflamación o vesiculitis, la cual se caracteriza por la presencia de dolor a la palpación, aumento de tamaño, pérdida de las lobulaciones y adherencias. En algunos casos las glándulas se pueden palpar duras y fibroticas. Cualquier asimetría debe ser considerada con reserva por el evaluador. En algunos casos, de vesiculitis se puede observar flóculos de pus en el eyaculado.

Las ampollas son el segmento terminal ensanchado de los conductos deferentes; miden entre 10 y 15 centímetros de largo y se sienten al hacer presión hacia el piso de la cavidad pélvica, entre las glándulas vesiculares. Se palpan como dos estructuras semiduras del grosor de un lápiz. Es poco común que se inflamen, pero cuando lo hacen es posible observar material purulento en el eyaculado.



Figura 2. Evaluación de los genitales internos en el macho bovino.

Evaluación funcional de la libido y prueba de capacidad de servicio

La libido o deseo sexual en el macho se define como el apetito de montar a la hembra, mientras que la habilidad copulatoria es la capacidad de completar el servicio. Se debe recordar que no existe correlación entre libido y perímetro testicular. Durante el examen funcional se debe prestar atención a la cadena de reflejos sexuales, para determinar la existencia de alguna patología que impida el correcto servicio.

La manera como el toro realiza el contacto con la hembra no es simple y refleja una serie de eventos fisiológicos complejos, los cuales requieren de una gran coordinación por parte del animal. En la evaluación de la capacidad de servicio, se evalúan todos los eventos del comportamiento sexual del macho, estos incluyen: la búsqueda y detección, excitación, flehmen, erección y protrusión del pene, monta, penetración con o sin eyaculación, eyaculación y desmonta.

También es importante el período refractario o de latencia que es el tiempo transcurrido entre una eyaculación y la subsiguiente, y el tiempo de reacción que es el tiempo transcurrido desde que el animal entra en contacto con la hembra y se produce la primera eyaculación.

Recolección de semen en el bovino

La recolección de semen se realiza por el método parafisiológico de la vagina artificial o por el método físico de la electroeyacuación. El método de la vagina artificial requiere de la utilización de un animal para la monta (macho o hembra) o un maniquí y una vagina artificial; este método simula la monta natural y permite la obtención de una muestra de semen de excelente calidad, que se puede considerar como característica de la eyacuación de un toro. Además, tiene la ventaja que permite la observación del comportamiento del animal en movimiento y durante su apareamiento.

La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de siete centímetros de diámetro y 35–40 centímetros de largo, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45–46 °C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, lográndose así la eyacuación.

En uno de los extremo de la vagina artificial se coloca un embudo de látex o goma que sostiene en su extremo un tubo graduado, el cual recibirá el eyaculado, este último se protege dentro de un envase plástico que contiene agua a 37 °C, a fin de evitar cambios de temperatura (choque térmico). El otro extremo de

la vagina artificial se lubrica ligeramente, utilizando lubricante no espermicida, siendo este el extremo por donde penetrará el pene, durante el proceso de recolección.

El área de recolección de semen debe contar con un puesto de monta, piso sólido y antiresbalante, defensas de seguridad y un ambiente de trabajo cónsono con la actividad que se realiza (evitar ruidos y distracciones), además debe estar ubicado cerca del laboratorio.

La recolección de una buena muestra requiere de la estimulación previa del semental, para ello se recomienda una secuencia de falsas montas y períodos de restricción, antes de recolectar cada eyaculado. La agresividad sexual del animal al momento de la recolección permitirá combinar el estímulo adecuado para lograr un eyaculado de buena calidad.

La preparación sexual del semental implica el uso de la monta restringida en el ambiente preparado para tal fin, la retención del semental consiste en permitir su acercamiento al puesto de monta, a fin de estimular al macho, sin permitir la monta (restricción). La falsa monta consiste en estimular al animal permitiendo la erección y el intento de monta para luego desviar el pene manteniendo el glande al aire e impidiendo todo contacto con la monta.

Una vez que se considere el animal adecuadamente estimulado, se procede a la recolección del eyaculado por medio de la vagina artificial. Los mejores resultados para la recolección de semen por esta vía se obtienen siguiendo la secuencia siguiente: una falsa monta, dos minutos de restricción, dos falsas montas y la recolección. Este protocolo maximiza la concentración de espermatozoides por eyaculado.

Para proceder a la recolección del eyaculado con el animal y la vagina artificial, previamente preparados, un operador diestro

se coloca del lado derecho del toro, al momento del intento de monta desvía el pene tomando prepucio con la mano izquierda hacia el lado derecho impidiendo todo contacto con la monta. Con la mano derecha, sosteniendo la vagina artificial, se coloca el extremo lubricado por delante del pene, y como respuesta al estímulo (presión y temperatura) semejante a la vagina de la vaca en celo, el toro penetra la vagina en toda su extensión, realizando lo que se conoce como golpe de lomo.

La eyaculación del bovino se considera monofásica y sumamente violenta (segundos), después de la eyaculación el animal desmonta casi inmediatamente, entonces, se procede a retirar el tubo graduado (conteniendo el eyaculado), protegiéndolo debidamente de la luz solar directa, cambios drásticos de temperatura (choque térmico) y contaminación, se identifica la muestra y se entrega en el laboratorio para su procesamiento inmediato.

Con la utilización del electroeyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha. Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica (emisión).

Por otro parte, la respuesta nerviosa viaja vía nervios parasimpático para provocar la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral (músculo isquiocavernoso, bulboesponjoso y uretral), lo cual que resulta en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha (Figura 3).



Figura 3. Electroeyaculador y materiales necesarios para la recolección de semen.

Antes de la utilización del electroeyaculador se procede a la preparación del animal, lo cual incluye: recortar los pelos del orificio prepucial y limpiar el exceso de sucio (bosta y barro), si es necesario se debe lavar y secar cuidadosamente el área. Un ayudante procede a limpiar el recto y a estimular mediante masaje transrectal las glándulas accesorias (glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes) y, posteriormente, se introduce el electrodo adecuado (Figura 4).

Cuando se utiliza la electroeyaculación se inician los estímulos a mínima intensidad y rítmicamente se incrementa, de acuerdo con la reacción del animal, cada estímulo debe durar menos de



Figura 4. Preparación del macho para la recolección vía electroeyaculador (lavado y corte de pelos del prepucio).

un segundo y se deben aplicar entre cinco y 10 estímulos por cada grado de intensidad. Las reacciones son muy variables entre animales y aun en el mismo animal.

El recolector debe ser capaz de reconocer la fracción preespermática y sólo recolectar la segunda fracción rica en espermatozoide. Para la recolección del eyaculado se utiliza un aparato, el cual consiste en un aro de plástico con mango que sostiene un embudo de látex o plástico y un tubo graduado para la recolección del eyaculado (Figura 5), este último se protege con un envase plástico y agua a 37 °C.

Régimen de colección de semen: Si se cuenta con reproductores de alto valor genético y se desea obtener el mayor número de dosis de semen de alta calidad a fin de transmitir esas cualidades a un mayor número de descendientes, se dispone de dos recursos para aumentar el número de espermatozoides recogidos por unidad de tiempo, ellos son: la preparación sexual previa a la colección, cuyas ventajas son reconocidas y el aumento de la frecuencia de eyaculación.

Estudios en la raza Holstein sugieren una frecuencia de recolección de dos eyaculados dos veces por semana para reproductores de 44 meses. Mientras que estudios en las razas Brahmán rojo y blanco sugieren una frecuencia de dos eyaculados una vez por semana en reproductores de 48 a 60 meses; recomendándose una abstinencia sexual entre cinco y siete días al iniciar el período de recolección.

El intervalo de recolección de semen es de suma importancia, debido a que una alta frecuencia puede afectar la concentración espermática y la madurez de los espermatozoides. Por el contrario, una baja frecuencia de colección puede afectar la motilidad espermática y su vitalidad.

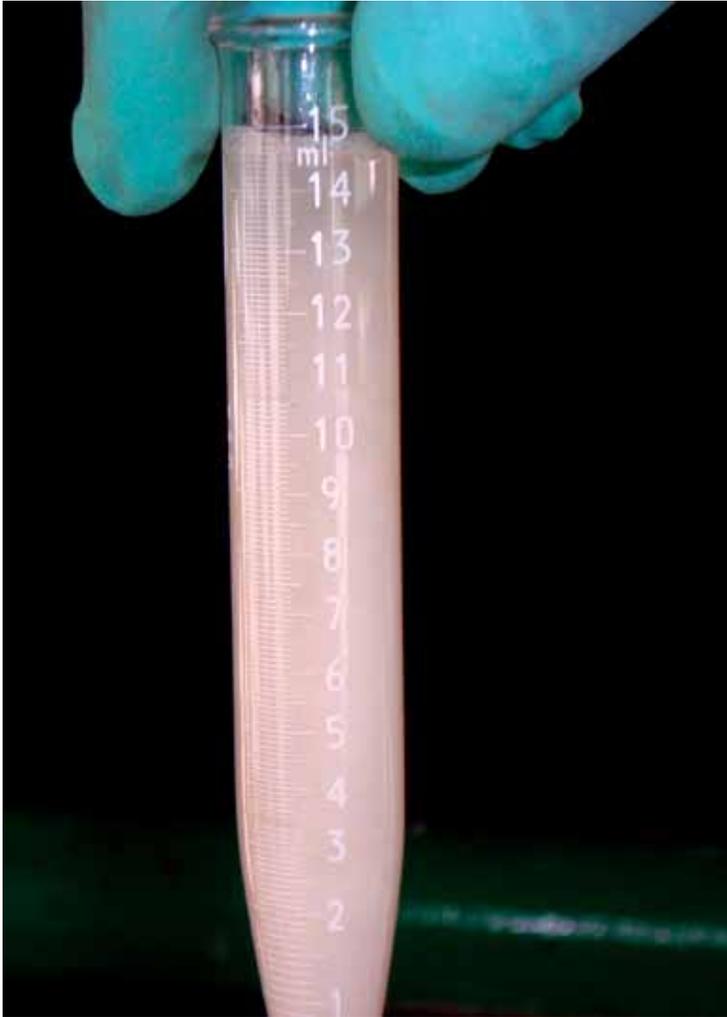


Figura 5. Semen recolectado por medio de electroeyaculador.

Evaluación de semen de bovino

Para considerar a un toro como apto desde el punto de vista reproductivo, asumiendo que es un animal clínicamente sano, este debe cumplir con tres requisitos básicos: buena libido, buen estado clínico reproductivo y buena calidad espermática. La evaluación del semen es un elemento importante para la certificación de la aptitud reproductiva en un toro. Una vez que el semen recolectado llega al laboratorio, este se debe colocar en baño María, a una temperatura de 37 °C para comenzar con su evaluación.

La evaluación macroscópica del semen debe incluir los parámetros siguientes:

Volumen: primero se registra el volumen contenido en el tubo graduado de recolección, luego con el uso de una pipeta graduada se aspira toda la muestra y se registra su volumen. En cuanto al volumen existen algunos valores de referencia, tanto para el semen obtenido con vagina artificial como para las recolecciones con electroeyaculador.

Se ha señalado, basado en experiencias con vagina artificial, que el eyaculado de un toro joven tiene en promedio un volumen mayor a dos mililitros, mientras que un toro adulto tiene un volumen mayor a cuatro mililitros. Las pruebas con electroeyacu-

lador indican como valores normales volumen superior a cinco a siete mililitros. Al multiplicar el volumen por la concentración espermática, se obtiene el número total de espermatozoides por eyaculado.

Color: generalmente el semen es de color blanco y la densidad de la muestra estará en relación directa con la concentración de espermatozoides. Las muestras más densas serán de color y aspecto más cremoso, mientras que las más diluidas, serán de aspecto lechoso y hasta completamente claro y transparente, como es el caso de aquellos animales con oligospermia o azoospermia. En el cuadro 2 se muestra la relación entre el color del semen recolectado y su concentración en número de espermatozoides por milímetros cúbicos (mm^3).

En algunos toros se puede observar eyaculados de color amarillento; esto se corresponde con un pigmento llamado riboflavina que se produce en las glándulas seminales y que es inocuo. También se puede observar una coloración rojiza, la cual indi-

Cuadro 2. Relación entre el color del semen recolectado y su concentración en número de espermatozoides por milímetros cúbicos (mm^3).

Color	Nº de espermatozoides (esp)
Blanco cremoso	≥ 1000000 esp./ mm^3
Blanco lechoso	800000 – 600000 esp./ mm^3
Blanco acuoso	< 50000 esp./ mm^3

Fuente: Rosemberger, 1981.

ca la presencia de sangre fresca, mientras que un color pardo señala la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica sucio. Los eyaculados con muy pocos espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa. El pus en el eyaculado se reconoce frecuentemente por los flóculos (piospermia).

Olor: las muestras de semen recogidas higiénicamente de toros sanos y fértiles tienen un olor catalogado como sui géneris, es decir, un débil olor aromático como a yema de huevo. Son motivo de rechazo un olor urinoso o pútrido, el cual se produce luego de contaminación, por ejemplo: materia fecal.

Aspecto: se entiende por aspecto del semen a la presentación luego de su colección, este puede ser: limpio, homogéneo, grumoso, sucio. El aspecto del semen va a depender del número de espermatozoides por milímetros cúbicos, a los componentes de secreción de las glándulas accesorias y eventuales agregados, como: sangre, pus, células epiteliales y suciedad.

Densidad macroscópica: para la densidad macroscópica se ha establecido un criterio basado en intervalos de concentración espermáticos, dependiendo de la opacidad de las muestras, lo cual indica una mayor o menos concentración espermática. En el cuadro 3 se indica la densidad macroscópica en base al número de espermatozoides por mililitro (concentración).

La evaluación microscópica debe incluir los elementos siguientes:

Motilidad masal: la evaluación de la motilidad masal indica la capacidad de movimiento de los espermatozoides en el eyaculado como un todo. En el caso del toro, por ser un eyaculado, generalmente, muy concentrado se puede realizar este procedimiento.

Para evaluar la motilidad masal se toma una gota de semen con una pipeta (una gota de semen entero es de 10 a 20 microlitro - ul), se coloca sobre un portaobjeto a 37 °C y se observa sin necesidad de cubreobjetos, en campo claro a un aumento de 100X.

El movimiento en masa dependerá de tres factores: concentración espermática, porcentaje de espermatozoides móviles en progresión lineal y velocidad de progresión de los espermatozoides (Figura 6).

Cuadro 3. Densidad macroscópica con base en el número de espermatozoides por mililitro (ml).

Densidad macroscópica	Nº de espermatozoides
Azoospermico	0 espermatozoides en el eyaculado
Oligospermico	Menor de 200 mill. Esp./ml
Ralo	200 – 500 mill. Esp./ml
Semidenso	500 – 800 mill. Esp./ml
Denso	800 – 1500 mill. Esp./ml
Densísimo	Mayor de 1500 mill. Esp./ml

Fuente: Rosemberger, 1981.

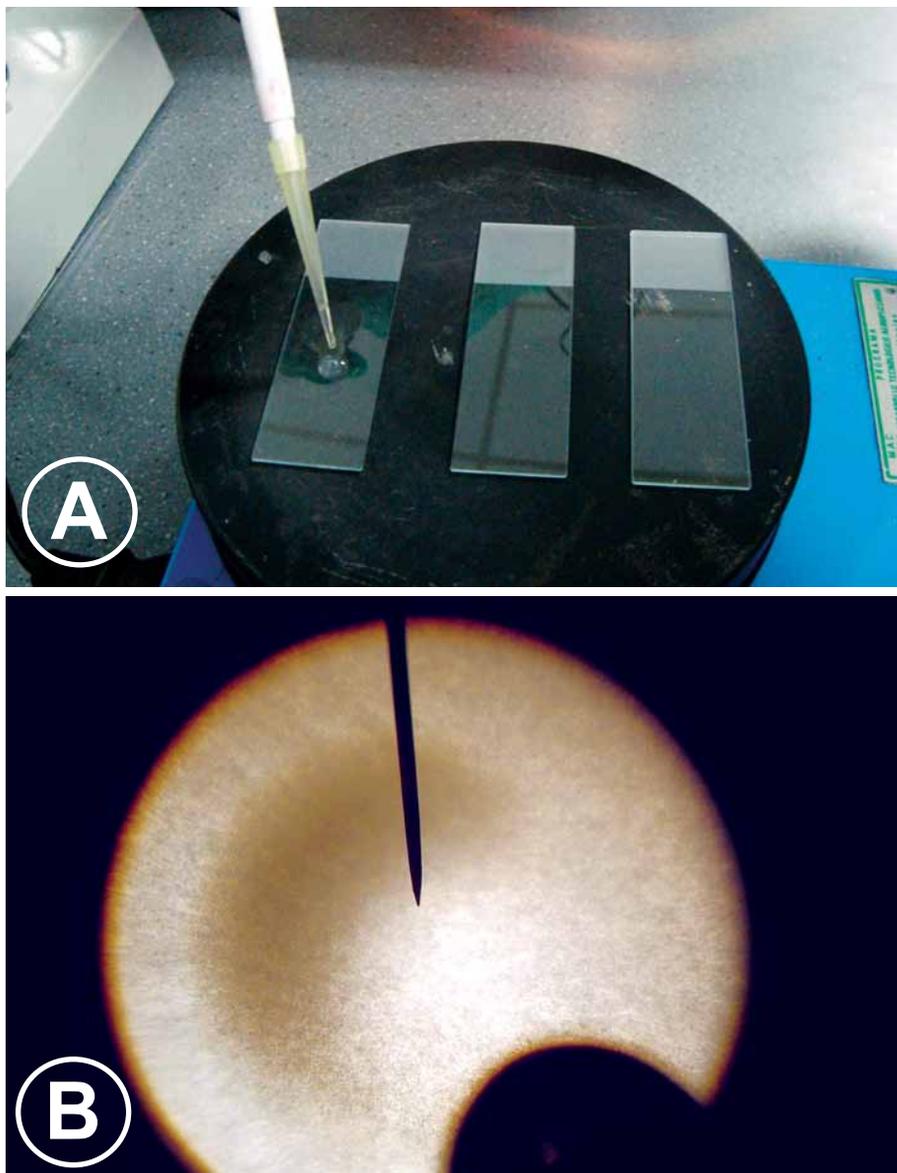


Figura 6. Evaluación de la motilidad masal, A) Colocación de gota de semen en el portaobjetos y B) Observación microscópica (100X).

En el Cuadro 4 se muestra la clasificación de la motilidad masal presente en eyaculados de bovinos.

Cuadro 4. Clasificación de la motilidad masal.

Valor	Clasificación	Descripción
1	Excelente	Olas rápidas (+++)
2	Bueno	Olas lentas (++)
3	Regular	Movimiento irregular (+)
4	Malo	Movimiento esporádico (-)

Fuente: Rosemberger, 1981.

Motilidad individual: la motilidad individual en una muestra de semen se expresa como el porcentaje (%) de células móviles bajo un campo microscópico. Un espermatozoide de motilidad progresiva es aquel que se mueve de un punto a otro en una línea más o menos recta. Gran parte de los espermatozoides podrán tener otros tipos de motilidad; esto incluye movimientos circulares, así como inversos, debido a anomalías en la cola y a un movimiento de vibración o de oscilación, asociado a menudo al envejecimiento.

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

El semen de toro es demasiado concentrado como para hacer una determinación exacta de la motilidad individual, sin diluir el semen. Un volumen pequeño de la muestra se debe diluir con una solución isotónica (con la misma concentración de iones libres que en el semen), para poder observar individualmente a los espermatozoides. Se utiliza cloruro de sodio a 0,9% o citrato de sodio a 2,9%. Luego se coloca una gota diluida (10 a 12 microlitros - ul) en un portaobjeto y se cubre para observar al microscopio. En toros esto requiere de una dilución de uno en 100 (Figura 7).

En el Cuadro 5 se muestra la clasificación dada a la motilidad individual en eyaculados de bovino.

Cuadro 5. Clasificación de la motilidad individual en eyaculados bovinos.

Descripción	Valor	Clasificación
1	Excelente	> 70%
2	Bueno	50 – 70%
3	Regular	30 – 50%
4	Malo	< 30%

Fuente: Rosemberger, 1981.

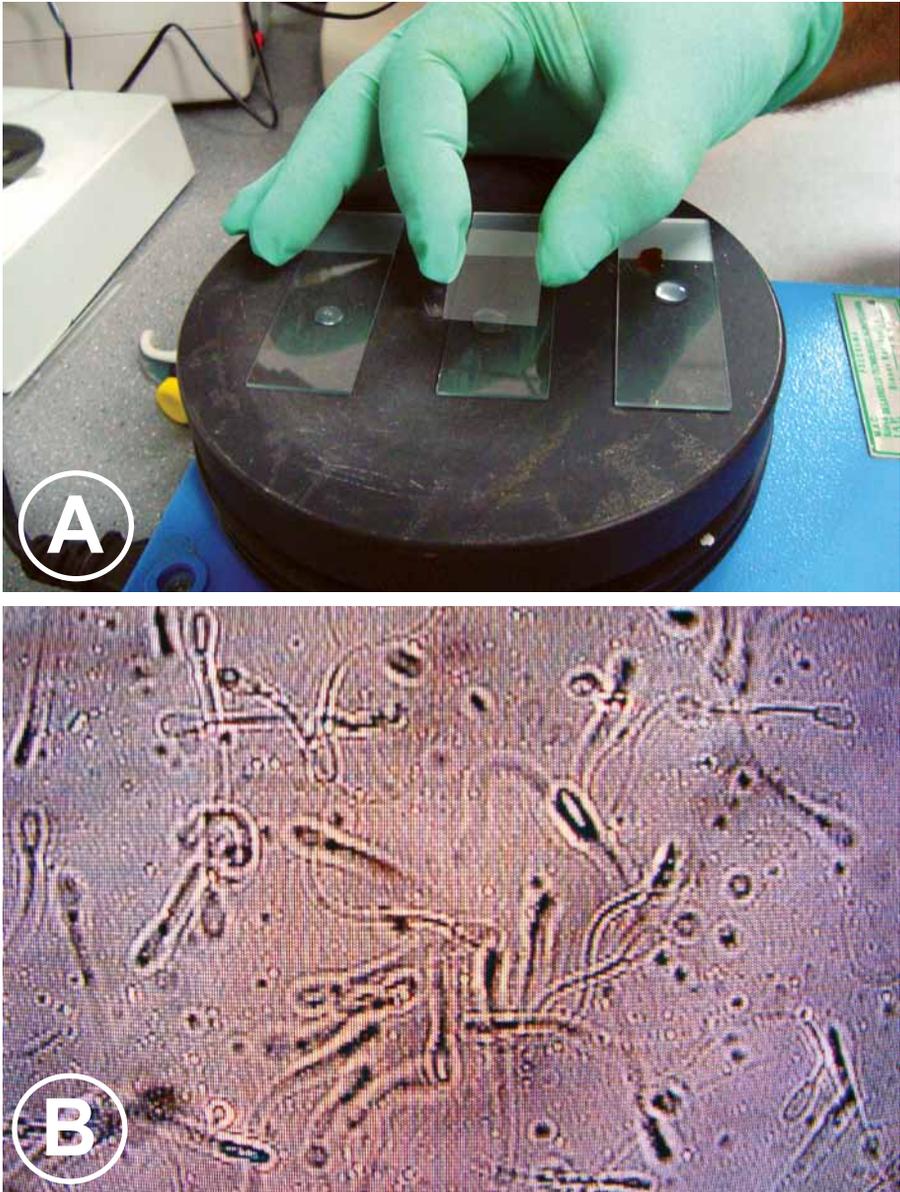


Figura 7. Evaluación de la motilidad individual: A) Colocación de gota de semen diluido en el portaobjetos y B) Observación microscópica (100X).

Vitalidad: existe un conjunto de técnicas que permiten una coloración selectiva entre espermatozoides vivos y muertos, esto como consecuencia de los cambios bioquímicos que se producen tras la muerte del espermatozoide (acción cromacitológica).

La técnica se realiza extrayendo una gota, de aproximadamente 10 microlitos (ul) de semen puro y colocándola sobre la punta de un portaobjetos limpio y desengrasado, previamente atemperado a 36-37 °C sobre la platina térmica. Sobre esta gota se coloca una gota de aproximadamente 30 microlitos (ul) del colorante vital eosina, el cual debe estar a la misma temperatura del semen en un tubo de ensayo dentro de un baño María (Figura 8). Se mezcla semen y colorante suavemente, con la punta de la pipeta por aproximadamente 20 segundos. Luego con otro portaobjetos, también atemperado, se apoya sobre el borde de la gota para que por capilaridad se distribuya sobre el portaobjetos, luego se levanta y se realiza el extendido en forma firme. Se deja secar sobre la platina térmica y se procede a su lectura.

El fundamento de esta técnica es el siguiente: el colorante penetra la membrana de los espermatozoides muertos, dejando sin teñir los que se encontraban vivos al momento de realizar la tinción. Para sacar el porcentaje de espermatozoides vivos se procede a observar el frotis a 400 aumentos, contando en guarda griega todos los espermatozoides de cada campo evaluado, discriminando los que están teñidos, como muertos, y los sin teñir, como vivos. Se cuentan no menos de 100 células y se saca el porcentaje. Se considera como valor mínimo aceptable 70% de espermatozoides vivos.

Otros sustitutos eficaces de la eosina como colorante vital son el rosa de bengala, la eritrosina, el verde cresol o el azul de bromofenol con el que se ha tenido más claridad en la interpretación; mientras que, en todo caso, como colorantes de fondo se prefiere el azul de anilina o la nigrosina. Con el colorante eosina-

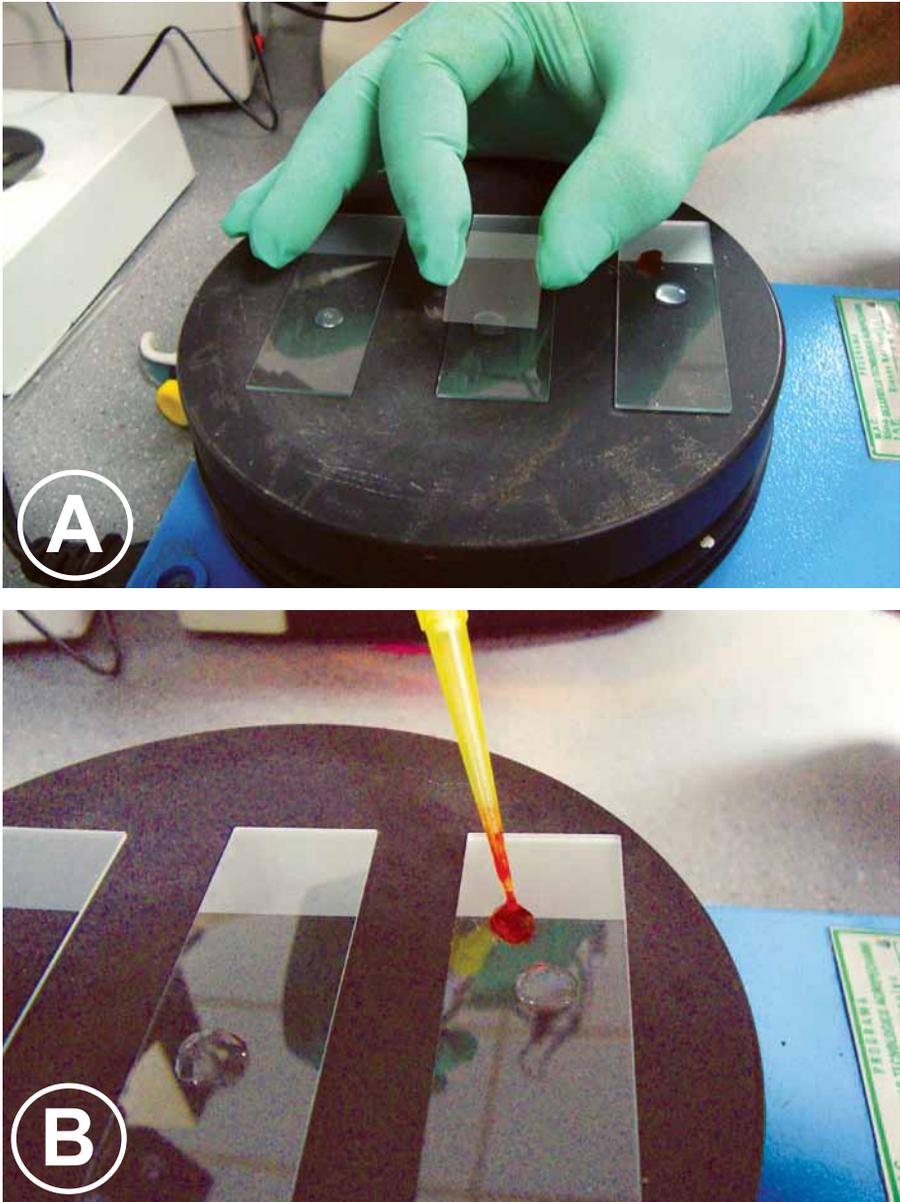


Figura 8. Colocación de la gota de semen diluido (A) y la gota del colorante vital (B).

nigrosina los espermatozoides muertos aparecen teñido en rojo o en rosa, mientras que los vivos quedan sin teñir.

Morfología del espermatozoide: el sistema de clasificación que ha sido aceptado ampliamente en bovinos es el de las atipias o defectos espermáticos primarios y secundarios. Por definición, un defecto primario es el que se origina dentro del testículo durante la espermatogénesis, mientras que un defecto secundario es el que se origina dentro del epidídimo.

Se ha demostrado la correlación entre defectos morfológicos del espermatozoide e infertilidad y se ha establecido 30% como un porcentaje aceptable o máximo permitido de atipias, es decir, se acepta 70% de espermatozoides normales. Se ha establecido un límite de defectos de la cabeza de 15 a 20%, mientras que defectos del acrosoma y defectos de la cola se toleran en 25%.

Se han desarrollado muchos métodos o pruebas para valorar la morfología espermática, las cuales se pueden conseguir con coloraciones sencillas, como la eosina-nigrosina-giemsá fácil de realizar cuando se evalúa un semen tal a campo (Figura 9).

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación del ovulo por el espermatozoide por contener las enzimas necesarias para la penetración del cumulo oophurus y de la zona pelucida. La reacción acrosomal, previa a la fecundación, produce puntos de fusión de la membrana apical celular con la membrana externa del acrosoma y forma vesículas para que el contenido enzimático pueda ser liberado ejerciendo su actividad sobre el ovocito.

Las alteraciones del acrosoma o del proceso de capacitación inhiben la fecundación de la célula espermática, mientras que el proceso de congelación de semen produce daños en la membrana del espermatozoide y del acrosoma, a pesar de la presen-

cia de un agente crio protector en el diluyente de congelación. Este agente reduce los daños al acrosoma pero siempre se espera una reducción en la motilidad individual como producto del deterioro de la membrana y del acrosoma.

La integridad del acrosoma se puede evaluar con diferentes métodos microscópicos y utilizando diferentes técnicas de tinción, como Giemsa, Naphtol amarillo y eritrosina B. Sin embargo, el método más práctico y rutinario es la fijación en glutaraldehido y observación en un microscopio de contraste de fase.

El aumento de espermatozoides con daño en el acrosoma pre-congelación es una evidencia de baja calidad seminal y se puede incluso recomendar el descarte de esa muestra para



Figura 9. Evaluación microscópica de la vitalidad y morfología espermática (400X).

congelación. El aumento excesivo de acrosomas dañados pos-congelación pudiera indicar algún problema en el proceso de congelación o estar relacionado con una composición lipídica de la membrana anormal que incide en una mayor susceptibilidad del espermatozoide al enfriamiento.

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

El recuento directo de células espermáticas se realiza utilizando el hemocitometro. El hemocitometro (Cámara de Neubauer) fue diseñado para contar eritrocitos, la cual consiste en una lámina especial que tiene dos cámaras de conteo.

Las cámaras de conteo tienen 0,1 milímetro de profundidad y un área graduada en el fondo de la cámara de un milímetro al cuadrado. Esta cuadrícula central se divide en 25 cuadros más pequeños. Al conocerse la profundidad y el área es posible determinar el número de espermatozoides en un volumen dado (Figura 10).

Por lo general, se utiliza un factor de dilución de 1 en 200 en el caso del semen del toro, la solución utilizada para diluir el semen debe inmovilizar a los espermatozoides de tal manera que se pueda llevar a cabo el recuento; normalmente se utiliza una solución de cloruro de sodio a 3% (solución hipertónica) o solución salina formulada al tres por mil. De esa dilución se toman unos 20 microlitos (ul) y se depositan en el hemocitometro.

Para el cálculo de la concentración espermática se cuenta el número de espermatozoides en cinco de los 25 cuadros de la cuadrícula central (las cuatro esquinas y el centro). Este resulta-

do se multiplica por cinco que representa los cinco cuadros, por 200 que representa la dilución y por 10 que representa la altura de la cámara. De esa forma se obtiene el número de espermatozoides por milímetros cúbicos. El resultado se multiplica por 1.000 y se transforma en una medida volumétrica, entonces, la concentración queda expresada en cantidad de espermatozoides por mililitro.

Características físicoquímicas: el test de pH, generalmente, se incluye en los análisis de rutina como un parámetro orientador. El pH viene dado por el resultado de las secreciones ácidas



Figura 10. Cámara de conteo para la determinación de la concentración de espermatozoides por mililitro (número de espermatozoides por mililitro).

provenientes de la próstata y las secreciones alcalinas de las vesículas seminales. El pH en el semen del toro oscila entre 6,6 y 6,9 hasta 7 como valor normal. Si el pH excede de 7 se puede sospechar de algún tipo de infección y probablemente, en ese caso, disminuya la secreción de productos ácidos de la próstata, como el ácido cítrico. Se pueden registrar también valores de pH anormales en el caso de eyaculación incompleta.

Valores de pH extremadamente ácidos (>6,5) se encuentran en casos de agénesis o oclusión de las glándulas vesiculares. El pH se mide con un papel indicador, el cual se coloca en el semen sin diluir inmediatamente después de su recolección y enseguida después de diluir la muestra, para ello se deja caer una gota del semen mediante una pipeta capilar sobre el papel indicador y el reverso humedecido de este se compara inmediatamente con la escala de color de pH.

Dilución y congelación de semen de bovino

Una vez que los espermatozoides son eyaculados, la supervivencia de los mismos en el plasma seminal sólo se limita a pocas horas. Por lo tanto, con el fin de mantener a los espermatozoides vivos y con buena motilidad durante periodos más largos de tiempo, enfriar o crioconservar, se hace necesaria la dilución del eyaculado con soluciones protectoras.

Se han utilizado diferentes soluciones como diluyentes o expansores del semen, la mayoría son variaciones de unas cuantas fórmulas principales, casi todos los diluyentes para preservar semen o congelarlo tienen yema de huevo o leche descremada o bien una combinación de esos dos ingredientes básicos.

Los constituyentes de un buen diluyente para la preservación y crioconservación de semen deben reunir las características siguientes:

- Abastecer de nutrientes como fuente de energía para el metabolismo espermático, los azúcares simples, como glucosa o fructosa, proporcionan esa fuente de energía al espermatozoide y los disacáridos y trisacáridos no son metabolizados para la obtención de energía, sino que actúan como crioprotectores adicionales.

- Proteger a los espermatozoides contra el efecto dañino del enfriamiento rápido, con ese fin son utilizados la yema de huevo o la leche para proteger a los espermatozoide del choque frío, especialmente, en el paso del eyaculado de la temperatura corporal a 5 °C en el proceso de congelación, también estas sustancias orgánicas tienen nutrientes, los cuales son utilizados por los espermatozoides.
- Proporcionar un ambiente de pH estabilizado para prevenir los cambios dañinos en el pH cuando se forma ácido láctico, la solución buffer más usada es el Buffer Tris, el cual mantiene el pH casi neutro.
- Mantener la presión osmótica adecuada y el equilibrio electro-lítico correcto.
- Inhibir el crecimiento bacteriano, para ello se utiliza antibióticos, como Lincospectin, Penicilina o Estreptomina.
- Aumentar el volumen del semen de tal manera que se pueda usar para múltiples inseminaciones.
- Proteger a las células espermáticas durante la congelación, en este caso se utiliza glicerol el cual desplaza el agua de la célula espermática impidiendo la formación de cristales de hielo.

En el Cuadro 6 se presentan las fórmulas para la preparación de un litro de los dos diluyentes más usados en criopreservación seminal, el Tris – Yema – Glicerol y el Citrato – Yema.

Cuadro 6. Formula de los diluyentes más utilizados en la críopreservación de semen de bovino.

Producto	Cantidad
Tris – Yema – Glicerol	
Buffer Tris	24,22 gr
Acido cítrico	13,60 gr
Fructosa	10,00 gr
Antibiótico Lincospectin	3 ml 150 mg/ml
Glicerina	60 ml
Yema de Huevo	200 ml
Agua Destilada	737 ml
Citrato – Yema	
Citrato de Sodio	74 partes
Yema de Huevo	25 partes
Glucosa	1 parte
Penicilina	1.000 u/ml
estreptomycin	500 mg/ml

Fuente: Salisbury *et al.*, 1982.

Cálculo del número de dosis para diluir y congelar

Titulo de dilución tomando en consideración el número de espermatozoide por dosis:

Pajuelas mini: N° esp./dosis: 20.000.000
 Volumen Dosis: 0.25 ml

Pajuelas media: N° esp./ dosis 30.000.000
 Volumen Dosis: 0.5 ml

a) Cálculo del número de dosis para la muestra de semen:

Volumen eyaculado x Concentración espermática (esp./ml)
 x Motilida individual

Numero de Dosis N° esp./ dosis

b) Cálculo del volumen de diluyente a utilizar:

N° de dosis x volumen de la pajueta a utilizar

Al volumen de diluyente calculado, descontar el volumen de semen para obtener el volumen real de diluyente a utilizar.

Dilución: en el proceso de dilución el semen, el diluyente y los frascos de dilución deben estar a una temperatura de 37 °C.

Enfriamiento progresivo: consiste en bajar la temperatura del semen diluido de 37 °C a 5 °C, este proceso debe ser controlado periódicamente de manera que la disminución de la temperatura sea de forma lenta y gradual, durante aproximadamente 45 a 60 minutos para evitar los daños causados por el choque térmico.

Equilibración (estabilización): proceso que consiste en mantener a 5 °C por un período de tres a seis horas para acondicionar los espermatozoides a la congelación posterior, durante este período se procede a efectuar la identificación, llenado y sellado de las pajuelas.

Congelación horizontal: consiste en realizar la congelación de las pajuelas de semen colocadas en la rampa de congelación en los vapores del nitrógeno líquido, por un tiempo de 10 minutos. A una temperatura aproximada de 110 °C.

Almacenamiento temporal: las pajuelas permanecen en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C, hasta realizar el examen microscópico a las 24 horas y a los 15 días poscongelación para verificar la motilidad individual.

Almacenamiento definitivo: las pajuelas permanecen en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C, si reúnen buenas características de supervivencia espermática (motilidad individual poscongelación).

Evaluación del semen congelado

Entre las características microscópicas en el examen de rutina poscongelación pueden señalar las siguientes:

Motilidad individual y vigor espermático: la motilidad de una muestra de semen recientemente obtenida no es una buena predicción de su fertilidad, ni de la capacidad de los espermatozoides para sobrevivir al proceso de congelación.

La evaluación de la motilidad individual en semen fresco es importante para la identificación de eyaculados, los cuales pudieran estar por debajo del valor normal (50% de motilidad individual), por lo que muestras con esos valores deberían desecharse. Esto implica que si ella es muy baja en semen fresco, esta tenderá a disminuir aun más en la evaluación poscongelación y reducirá el número de dosis, debido al proceso de congelación.

La valoración exacta del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva es de gran importancia después de la congelación. Se ha demostrado que una fertilidad óptima se produce cuando el número de espermatozoides móviles en progresión poscongelación varía entre cinco a 15 millones por unidad o dosis, dependiendo del grado de fertilidad del toro. Debido a que el semen de diferentes toros varía fuertemente en el porcentaje de células que sobreviven a la congelación, el número total de

espermatozoides colocados en cada dosis puede ser diferente de un toro a otro.

Si el carácter de motilidad progresiva para el semen de un toro muy fértil es de 50% poscongelación, la concentración total de espermatozoides en cada dosis puede variar desde 10 a 20 millones. Por otra parte, si la motilidad individual tras la descongelación se halla normalmente alrededor de 25% en otro toro, la concentración total de espermatozoides por dosis deberá ser mayor. Conforme varía la motilidad individual tras la descongelación, la concentración total de espermatozoides por dosis debe ser ajustada.

Para la evaluación del semen poscongelación, este debe ser incubado a 37°C durante dos horas. Esta evaluación es conocida como prueba de termo resistencia o de incubación. El porcentaje de motilidad progresiva y el vigor son determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de dos horas de incubación. Una gota de semen delgada y uniforme se coloca entre porta y cubreobjetos tibios, procediendo a evaluar a 100 aumentos el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y, luego, la tasa de progresión (vigor).

La motilidad individual posdescongelación puede ser cuantificada utilizando la escala indicada en el Cuadro 7.

El semen de buena calidad, el cual ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene entre 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de tres a cuatro puntos. Después de dos horas de incubación, estos valores, generalmente, disminuyen de 10-15% y un punto, respectivamente.

Cuadro 7. Clasificación de la motilidad del semen descongelado.

Escala	Clasificación
0	Sin Movimiento
1	Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión
2	Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento
3	Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad
4	Movimiento progresivo rápido
5	Movimiento progresivo muy rápido

Fuente: Catena, 1999.

Las normas mínimas para motilidad y vigor son las siguientes:

Cuadro 8. Valores mínimos de vigor y motilidad del semen descongelado

Hora/descongelado	% esp. Movilidad progresiva	Vigor
0	25	3
2	15	2

Fuente: Catena, 1999.

- **Porcentaje de acrosomas intactos:** la determinación del porcentaje de acrosomas intactos es un método morfológico de medición de la viabilidad posdescongelación, el cual tiene correlación con la fertilidad. Es un valioso complemento de la motilidad, para determinar la viabilidad y fertilidad potencial del semen congelado.

Para examinar el acrosoma, el movimiento de los espermatozoides debe ser detenido. Esto se logra mezclando el semen con glutaraldehído bufferado a 0,2%, que fija las membranas y previene su deterioro posterior.

La preparación puede ser hecha sobre el portaobjeto, colocando una pequeña dosis de semen próxima a una gótica de glutaraldehído mezclándolas bien y colocándoles un cubreobjetos. Doscientas células deben ser examinadas a 1.000 aumentos, inmediatamente después de descongelado el semen y luego de dos horas de incubación.

Los valores mínimos porcentuales para una clasificación satisfactoria del acrosoma del semen descongelado, de acuerdo a Catena (1999) son:

50% de acrosoma intactos para cero hora de descongelación

35% de acrosoma intactos para dos horas de descongelación

- **Morfología espermática:** Se realiza igual que el semen fresco con un mínimo de espermatozoides normales del 70%. 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.
- **Concentración:** La concentración de una pajuela de 0,25 mililitros o 0,5 mililitros varía entre 20 a 30 millones de esperma-

tozoides totales por pajueta, de los cuales al ser descongelado deben existir un mínimo de 10 millones de células móviles por pajueta.

Para ello se realiza una dilución de 1/200 de la pajueta en solución salina formulada y se hace el recuento en la cámara de Newbauer. Luego se multiplica el resultado por 5.000.000 y por el porcentaje de espermatozoides móviles, obteniéndose el número total de espermatozoides móviles por dosis.

- **Examen microbiológico:** la contaminación del semen por la flora bacteriana, bien sea del tipo sanitario o por deficiencias de la higiene, incide enormemente en la economía y en determinados aspectos de la reproducción de la hembra, como disminución de la fertilidad y aumento de la mortalidad embrionaria. Puesto que muchos microorganismos no tienen su origen ni en los testículos ni en las glándulas accesorias, es muy importante seguir correctamente los procedimientos de recolección para minimizar el riesgo de contaminación del semen.

Es importante hacer un buen control microbiológico del semen, ya que a veces se pueden encontrar altas concentraciones de bacterias, lo cual hace descender significativamente la capacidad de crioconservación y la fertilidad de ese semen.

Los problemas de contaminación se resuelven mediante pruebas de sensibilidad de estos agentes frente a antibióticos, adicionándose a la dosis seminal para conseguir una buena inhibición del crecimiento bacteriano.

- **Examen biológico:** debido a que la fecundación es una de las claves para determinar la fertilidad *in vivo* de un macho, el desarrollo de la técnica de fecundación *in vitro* se ha convertido en un procedimiento eficaz para predecir la fertilidad *in vivo* de un macho.

La fecundación *in vitro* consiste básicamente en la exposición de ovocitos maduros a espermatozoides capacitados, de tal forma que la fecundación se produzca fuera del aparato genital de la hembra, o sea, *in vitro*, en un laboratorio especializado de investigación en biotecnología reproductiva.

Los ovocitos se pueden obtener a partir de ovarios de matedero por punción de folículos de dos a cinco milímetros de diámetro, los cuales se maduran posteriormente *in vitro* en un medio especial de maduración, el cual, generalmente, es TCM-199 suplementado con piruvato de sodio, lactato de sodio, gentamicina y algunos medios adicionan hormona folículo estimulante (10 miligramos por mililitro), además de 20% de suero de vaca en estro (que contiene hormona luteinizante y hormona folículo estimulante).

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

- 1) Expansión de los cúmulos.
- 2) Aparición del primer glóbulo polar.
- 3) Aumento del espacio perivitelino y modificaciones citoplasmáticas: esclarecimiento periférico, condensación, entre otras.

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

Consideraciones finales

Con el desarrollo de las técnicas de inseminación artificial y trasplante de embriones en bovinos, se ha visto la necesidad de evaluar más rigurosamente el semen del macho reproductor, ya que resulta en un factor determinante para el éxito en la aplicación de las mencionadas biotecnologías reproductivas. Por tal motivo, el análisis básico del semen se ha enriquecido con la incorporación de nuevas técnicas y equipos para determinar con mayor exactitud las características convencionales del semen y, además, de la incorporación de nuevos parámetros.

Cabe destacar que un macho reproductor no sólo debe producir semen de alta calidad para ingresar a un programa reproductivo, si no también, debe poseer todas las herramientas fisiológicas necesarias que le permitan realizar efectivamente un servicio y así de esta forma, poder ser clasificado como satisfactorio y ser seleccionado como reproductor.

Por lo tanto, para garantizar la exactitud de los resultados del análisis del semen es necesario contar con profesionales especializados en el área, ya que son ellos los que decidirán mediante la evaluación, si un macho reproductor entra o no a un programa de servicios dentro de una unidad productiva o centro de congelación de semen e inseminación artificial.

Bibliografía consultada

Barham, B; Pennington, J. 2006. Breeding soundness evaluation for beef and dairy bulls. University of Arkansas, Cooperative Extension Service. [on-line] Disponible: <http://www.uaex.edu>

Carballo, DM; Canseco, C; García, R; Montiel, F. 2008. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. En Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz (21, 2008, Mexico) y del Trópico Mexicano (1, 2008, Mexico). p. 264 – 277.

Catena, M; Cabodevila, J. 1999. Evaluación del semen bovino. Simposio Internacional de Reproduccion Bovina (UNCPBA). Tandil. Taurus. 1(3):18-31.

Chayer, R; Pasqualini, C. 2009. Condición corporal como herramienta para el seguimiento del manejo nutricional de los vientres en rodeos de cría. [on-line] Disponible: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_condicion_corporal/25-texto.pdf.

González-Stagnaro C. (Ed.). 2005. Manual de ganadería de doble propósito. Maracaibo, VE. Fundación Girarz. p. 504-508

Hafez, E.S.E; Hafez, .B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7 ed. México. p. 375-386

Hidalgo, C; Tamargo, C; Diez, C. 2005. Análisis del semen bovino. Asturias, España. Información ganadera. 39 Boletín Informativo SERIDA. No. 2. p. 39-43

Madrid Bury, N; Bohada, E. (1993). Características de un buen reproductor bovino. FONAIAP Divulga. No. 44. [on-line] Disponible: http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/fonaiapdivulga/fd44/texto/caracteristicas.htm

Pérez y Pérez, F (Ed.). 1985. Reproducción animal, inseminación artificial y trasplante de embriones. Barcelona, España. Científico-Médica. p. 197-296

Roberts, S.J. 1986. Veterinary obstetric and genital diseases (Theriogenology). 3 ed. Beltsville, EE UU. p. 488-513

Rosemberger, G. 1981. Exploración clínica de los animales domésticos. Zaragoza Hemisferio Sur. p.12-22

Salisbury, GW; Van Demark, NL; Lodge, JR. 1982. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. 2 ed. Zaragoza, España. Acribia. p. 419-565

Sport, L; Carpenter, B; Thrift, T. 2009. Evaluación de la capacidad reproductiva de sementales *Bos indicus* y sus cruces en diferentes épocas del año en Tuzantla, Michoacán. Tesina. México. Universidad de Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. p. 49-70

Sportt, LR; Thrift, TA; Carpenter, B.B. 1998. Breeding soundness of bulls. Texas, EE UU. Agricultural Extension Service. L-5051. p. 3-7

Vera Muñoz, O. 2001. Técnicas de laboratorio para la evaluación del semental bovino. Seminario Internacional sobre biotecnología y patología reproductiva del bovino (1, 2001, Maracay, VE). Maracay, VE. IRAIA, FCV, UCV. p. 504-508

Vera, O; Bastidas, P. 1999. Análisis cromosómico y seminal de sementales Brahman de la Estación Experimental La Cumaca. Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. (4, 1999, Maracaibo, VE). Maracaibo, VE. p. 505-509



ISBN: 978-980-318-278-6



9 789803 182786