

Fisiología espermática, producción de semen y evaluación de la calidad seminal

R. Allende(*) y E. Arisnabarreta(**)

(*) M.V. Asesor Honorífico de CIAVT (**) M. V. Actividad privada

Resumen

Se realizó una síntesis y actualización bibliográfica sobre el proceso de la espermatogénesis, la estructura funcional del espermatozoide, la producción de semen, la calidad biológica del eyaculado fresco o procesado y la evaluación seminal convencional o subjetiva e incluso la valoración objetiva a través de la implementación de sistemas computarizados como el C.A.S.A. y la citometría de flujo. También, se hizo hincapié en la infertilidad de verano, fundamentalmente en lo que respecta a su influencia detrimental en la espermatogénesis. Al respecto, se tomó como fuente de datos los registros de 33515 eyaculados de reproductores *Bos taurus* y *Bos indicus* recolectados durante diez años. La peor calidad seminal, se obtuvo en los meses de enero-febrero para los toros *Bos taurus*, siendo el Polled Hereford la raza más afectada. En los reproductores *Bos indicus*, el mayor descarte de eyaculados, se produjo en el mes de abril.

Summary

A synthesis and bibliographic update was carried out on the spermatogenesis process, the functional structure of the sperm, the production of semen, the biological quality of the fresh or processed ejaculate, the conventional or subjective evaluation of the seminal quality and the implementation of objective analyzes through computerized systems such as C.A.S.A. and flow cytometry. Summer infertility was also emphasized, primarily with regard to its detrimental influence on spermatogenesis. In this regard, the records of 33,515 ejaculates of *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds collected during ten years were taken as a data source. The worst semen quality was obtained in the months of january-february for *Bos taurus* bulls, with Polled Hereford being the most affected breed. In *Bos indicus* breeds the largest discard of ejaculates occurred in april.

I. Breves nociones del proceso de la espermatogénesis y la estructura funcional del espermatozoide

.Espermatogénesis: La espermatogénesis es un largo pero ordenado proceso de diferenciación celular, que ocurre en los tubos seminíferos del testículo, a través de divisiones mitóticas, una meiosis o mitosis reduccional y numerosas transformaciones celulares. Benesch, citado por Roberts, 1971, estima que la longitud de los tubos seminíferos asciende a 6000, 5000, y 4000 metros en el verraco, toro y carnero, respectivamente.

Espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis son las tres divisiones del proceso de la espermatogénesis y están caracterizados por el desarrollo de la espermatogonia, espermatocono y espermátidas, respectivamente. Cada división toma, aproximadamente, un tercio de la duración de la espermatogénesis. En el toro estas divisiones toman 21, 23 y 17 días, respectivamente, para una duración total de 61 días.

En la figura 1, Barth y Oko, 1989, esquematizan, mediante un corte transversal de una parte del epitelio de los túbulos seminíferos, las diferentes etapas de la espermatogénesis y detallan los mecanismos de diferenciación celular que se mencionan seguidamente:

-las células madres de origen o espermatogonias están situadas en la capa basal de los túbulos seminíferos

-las espermatogonias, a partir de varias divisiones mitóticas, forman los espermatoconos que se ubican en una capa más alta

-los espermatoconos, luego de pasar por un largo proceso de mitosis reduccional o meiosis, forman la próxima capa de células haploides denominadas espermátidas

-las espermátidas, con posterioridad al complejo proceso de transformaciones para formar la capa final de espermátidas elongadas, las cuales están provistas de una cabeza y una cola para luego ser liberadas en el lumen de los túbulos seminíferos.

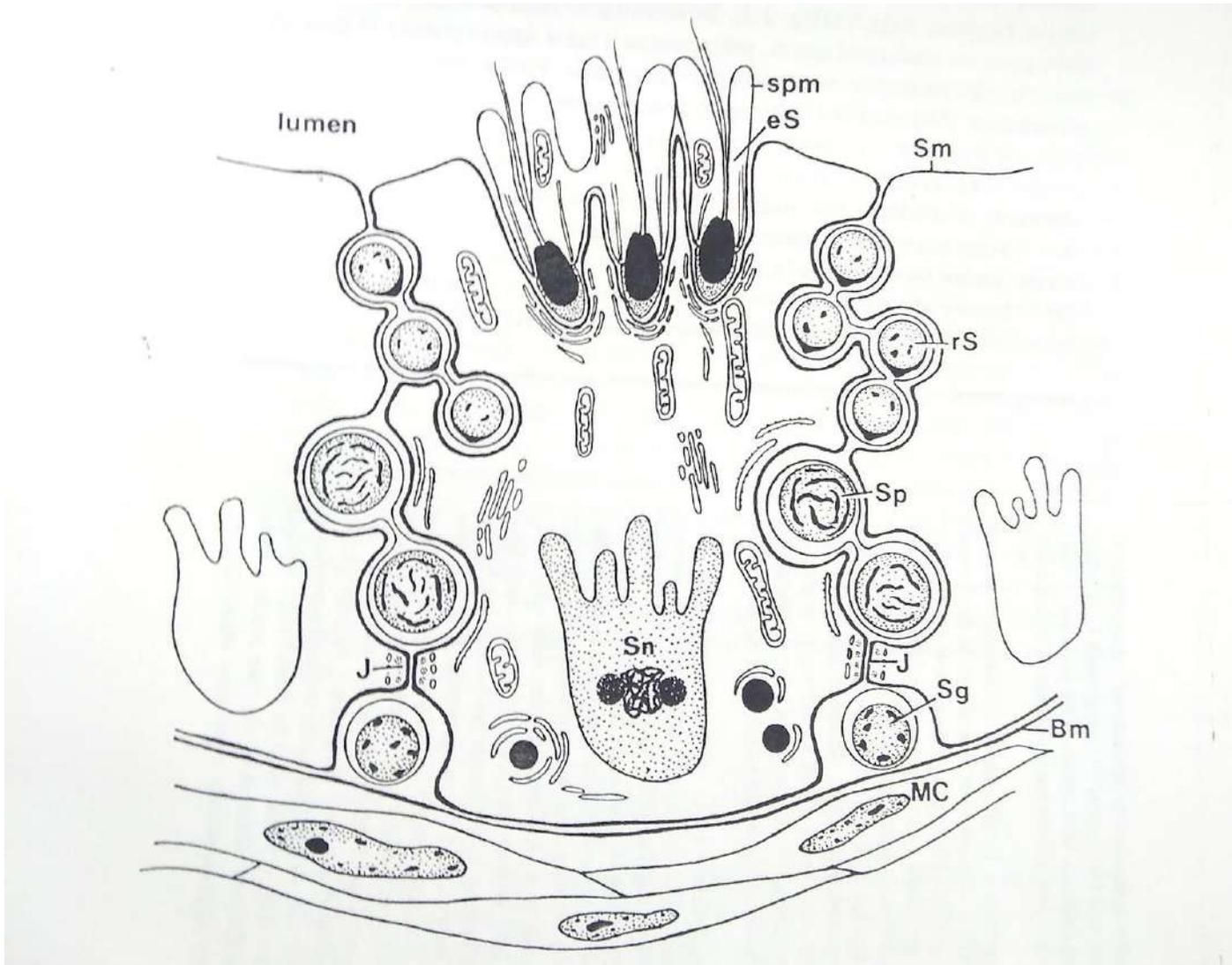
-Esta fase final de transformación celular se la denomina espermiogénesis.

-La diferenciación de las células germinales en su morfología final está siempre asociada con su movilidad ascendente en los túbulos seminíferos

-Las células de Sertoli, cuyo citoplasma abarca o envuelve a las células germinales, las asisten en su desarrollo y en su movilidad al proveerlas de un sustento estructural, además de requerimientos nutricionales y hormonales

En relación a las células de Sertoli, tipo de célula sustentacular, por virtud de una unión estrecha y continua entre éstas, dividen a los túbulos seminíferos en dos distintos compartimentos. Uno basal que contiene a las espermatogonias y a los espermatoconos preleptoteno, por leptoteno la fase de la meiosis y, el adluminal donde se relocalizan los espermatoconos primarios, hasta la terminación de la meiosis y espermiogénesis (June Mullins y Saacke, 2003).

Figura 1: Ilustración esquemática para mostrar las relaciones entre las células germinales y las células de Sertoli (Barth y Oko, 1989) (*)



(*) Sg: espermatogonia; Sp: espermatocitos; rS: espermatidas redondas; eS: espermatidas alargadas; J: juntas de las células de Sertoli; Bm: membrana basal; MC: células mioides; spm: membrana del espermia; Sm: membrana de la célula de Sertoli; Sn: núcleo de la célula de Sertoli;

Es importante destacar, de acuerdo con la descripción que realizan June Mullins y Saacke, que los tubos seminíferos muestran dos regiones bien marcadas que se diferencian claramente por su conformación y funciones:

- los túbulos intrincados, tubuli contorti, son tortuosos con un activo epitelio germinal
- los túbulos rectos, tubuli recti, caracterizados por ser más derechos, sin desarrollo de células germinales, que sirven como un conducto del contenido tubular hacia la rete testis alojada en el mediastino testicular.

En el proceso de la espermatogénesis un grupo de células madres, espermatogonias inactivas A1 y A2, es mantenido para proveer nuevas generaciones de éstas, denominadas las células madres de renovación. Por lo cual, en el macho adulto, se logra la producción continua de espermatozoides. El toro y el carnero durante la espermatogénesis, por cada espermatogonia activa, logran 16 espermatoцитos primarios. En esta etapa, se producen pérdidas celulares por degeneración, al ser estas células fagocitadas por las células de Sertoli (Ryan, 2015).

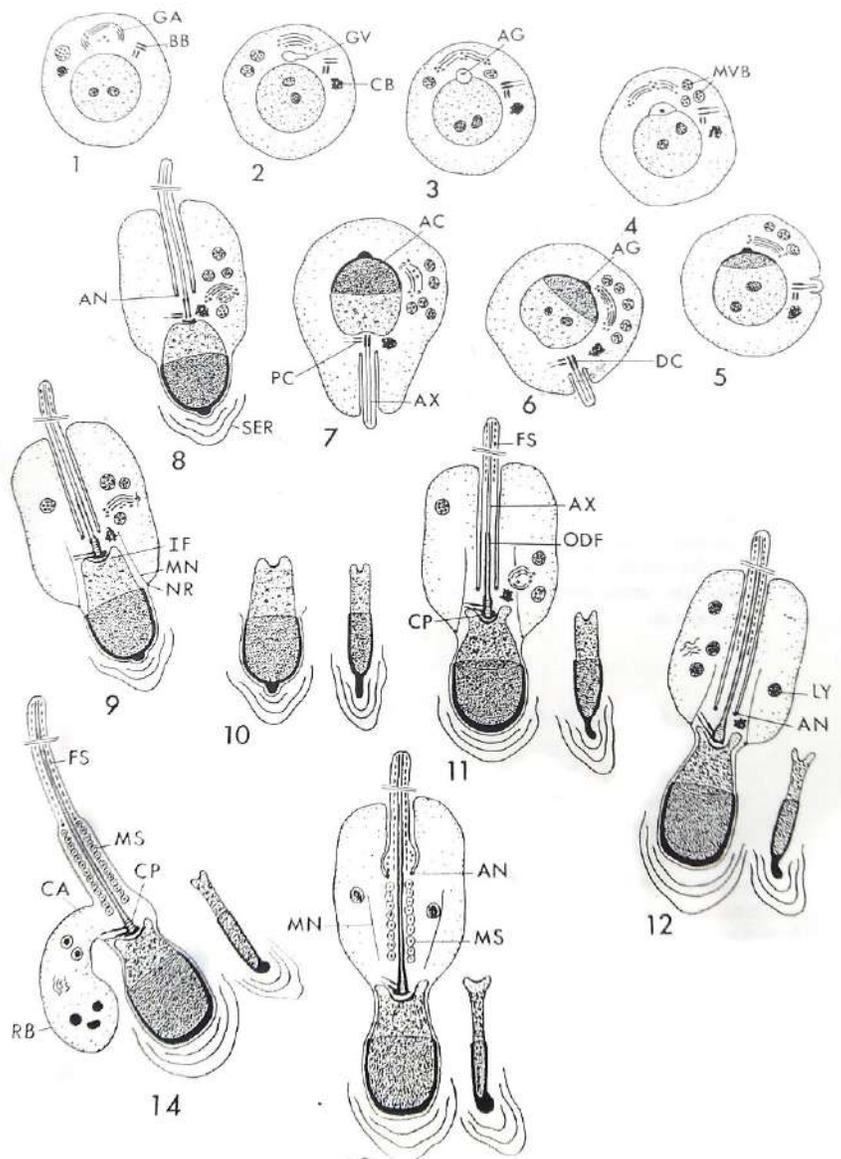
En la mitosis reduccional, además de dividir la cantidad de espermatozoides a la mitad, por la duplicación del ADN y el entrecruzamiento de los cromosomas, se asegura la diversidad genética. Estos eventos aleatorios, individualmente, producen espermatozoides genéticamente únicos. La replicación y el entrecruzamiento cromosómico, ocurren en la primera fase de la meiosis. En la segunda fase de la mitosis reduccional, se producen los espermatoцитos haploides. En el toro, al finalizar la meiosis, por cada espermatogonia B se producen cuatro espermátidas haploides, lo que hace un total de 64 espermátidas emergiendo de una espermatogonia A3 (Amann, 1991; Jhonson, et al, citados por Ryan).

La espermiogénesis, el proceso por el cual las espermátidas redondas haploides tienen una compleja serie de transformaciones para formar las espermátidas alargadas provistas de una cabeza y una cola, de acuerdo con Barth y Oko, se describe someramente a continuación en forma secuencial:

- puede dividirse en cuatro fases, denominadas de Golgi, del capuchón, del acrosoma y de maduración, las cuales se muestran en la figura 2
- en el toro la fase de Golgi es el lapso que se extiende desde la formación de la espermátida redonda (paso 1) hasta el gránulo acrosómico esférico asociado con la membrana nuclear (paso 3)
- las espermátidas con el crecimiento del capuchón cefálico se encuentran en la fase del capuchón (pasos 4-7)
- el período en el cual el núcleo y el acrosoma son sometidos a la mayoría de transformaciones profundas, condensación, elongación y forma, están referidos a la fase del acrosoma (pasos 8-12)
- la fase de maduración (pasos 13-14) durante la cual las espermátidas completan su diferenciación, es extremadamente complejo e incluye a la formación final del flagelo, el cuello y la condensación final y forma del núcleo

Barth y Oko, consideran que es fundamental, tener un conocimiento profundo de la morfogénesis de la cabeza y la cola, para interpretar las anomalías espermáticas.

Figura 2: Ilustración esquemática de la espermiogénesis, observada con microscopía óptica y electrónica, indicando los catorce pasos involucrados en la diferenciación de la cabeza y la cola espermática (Barth y Oko, 1989) (*)



(*) GA: aparato de Golgi; BB: corpúsculo basal; GV: vesícula de Golgi; CB: cuerpo cromatoide; AG: gránulo acrosómico; MVB: cuerpo multivesicular; AN: anillo; SER: retículo endoplásmico; PC: centriolo proximal; AX: axonema; AC: acrosoma; DC: centriolo distal; IF: fosa de implantación; MN: tubo caudal; NR: anillo nuclear; FS: vaina fibrosa; ODF: vaina fibrosa externa; CP: capítulo; LY: lisosoma; CA: centriolar adjunta; MS: vaina mitocondrial; RB: corpúsculo residual; CP: pieza intermedia.

La espermiación, la etapa final del desarrollo, comprende la liberación de los espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos. Una vez completada la espermiogénesis, los espermatozoides, a través de su cola, emergen del compartimento adluminal de los túbulos seminíferos hacia el ápex de las células de Sertoli y el lumen. Durante este proceso, de migración desde la rete testis hacia el epidídimo y la eyaculación, los espermatozoides pierden su gota citoplasmática sin embargo, no todos los que se encuentran en el eyaculado son normales.

.Transporte del esperma: El espermatozoide sale del testículo en forma diferenciada y, a través de 6 a 24 conductos eferentes, continúa su desarrollo y maduración en el epidídimo (dídimo = testículo), órgano esencial para el transporte, nutrición, almacenamiento y maduración espermática. La medida del tiempo desde la liberación del esperma en los tubos seminíferos hasta su exteriorización como esperma maduro en el eyaculado, depende del pasaje por el epidídimo y su almacenamiento, además del régimen de colecta de los eyaculados. Según Foote, citado por Roberts, este tubo flexuoso tiene un largo de 50, 30 y 20 metros para el verraco, el toro, y el equino, respectivamente. El transporte del esperma a través de los conductos eferentes, es llevado a cabo por las cílios de las células epiteliales y es consumado por la contracción localizada de los músculos lisos de la pared epididimal. La cola del epidídimo tiene un importante papel en el almacenamiento de los espermatozoides, donde permanece semanas y mantiene su poder fecundante. Una propiedad para retener la viabilidad del esperma es la temperatura constante, siempre por debajo de la testicular. En el esperma, los cambios funcionales más importantes ocurren a nivel de los conductos eferentes y cabeza del epidídimo. Las células espermáticas, en esas áreas incorporan el factor de decapitación, luego, en la parte distal del cuerpo y cola del epidídimo, adquieren su potencial para fertilizar

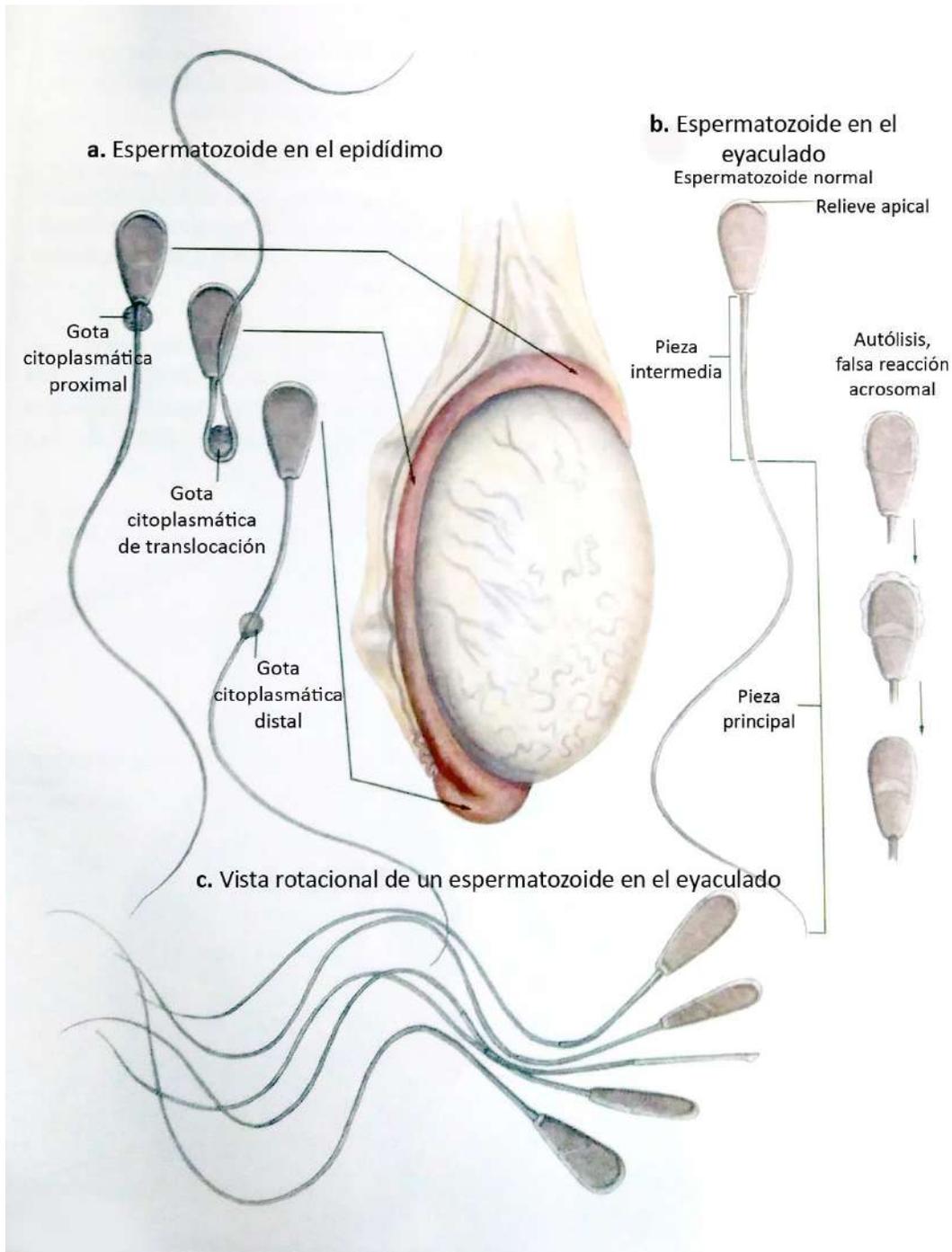
El tránsito del esperma, a través de los conductos eferentes y del epidídimo, está asociado con significativos cambios en la maduración del mismo que incluyen:

- aumenta la capacidad de la motilidad progresiva
- condensación final del núcleo y una fuerte modificación en la forma del acrosoma
- alteración de la superficie de la membrana plasmática (*)
- migración de la gota citoplásmica de proximal a distal
- reabsorción, fagocitosis y licuefacción de los espermias defectuosos.
- absorción de los líquidos de los tubos seminíferos y red testicular, aumentando de esa forma, la concentración espermática.
- la secreción epididimaria influye sobre la capacitación espermática.

(*)Los estudios demuestran, claramente, cambios cualitativos en la composición de la membrana plasmática durante la maduración epididimaria. Una característica importante en este proceso, es una gran alteración fisicoquímica de la membrana plasmática. Esto se relaciona con un aumento de la capacidad de los espermatozoides para interactuar con la zona pelúcida del ovocito, uniéndose al vitelo y penetrando posteriormente al óvulo.

En la figura 3 se muestran los cambios en la morfología espermática que ocurren en el pasaje de los espermatozoides, desde la rete testis, conductos eferentes, las distintas regiones del epidídimo hasta la eyaculación, observados con el microscopio de contraste diferencial de interferencia sistema Nomarski.

Figura 3: Cambios en la morfología de los espermatozoides en su pasaje desde la rete testis, el epidídimo hasta la eyaculación (June Mullins, K. y Saacke, R., 2003)(*)



(*) De acuerdo con June Mullins y Saacke, en la figura 3 se aprecian:

a. Espermatozoides en el epidídimo, de izquierda a derecha

-espermatozoides con la gota citoplasmática proximal, adyacente a la cabeza, observados en la rete testis, conductos eferentes y cabeza del epidídimo.

-espermatozoides con la gota citoplasmática de translocación, en la curvatura del flagelo, encontrados desde distal de la cabeza al cuerpo del epidídimo.

-espermatozoide con la gota citoplasmática distal, al final de la pieza intermedia del flagelo, hallados en la cola del epidídimo.

b. Espermatozoide en el eyaculado, de arriba hacia abajo mostrando, la cabeza con el relieve apical del acrosoma, las piezas intermedias y principal del flagelo, seguidos por espermatozoides con cambios secuenciales en el acrosoma, falsa reacción acrosomal asociado con muerte celular. En el acrosoma normal e intacto, de un espermatozoide viable, se manifiesta por el relieve apical, una sobre saliencia en el vértice apical de la cabeza espermática.

c. Observación rotacional de un espermatozoide nadando, con su cabeza en forma de paleta y la vista lateral de la cresta apical del acrosoma

.Duración del tránsito epididimal: En el toro, el tiempo de paso de las células espermáticas a través del canal epididimal, es de 8-11 días. El recorrido entre la cabeza y el cuerpo del epidídimo, no es alterado por la eyaculación, requiere de 3-5 días. Por el contrario, el período de almacenamiento en la cola del epidídimo es influenciado por la eyaculación y, en machos sexualmente descansados el rango de permanencia de los espermatozoides es de 3 a 14 días, pudiendo mantener las reservas equivalentes de seis a siete días de producción espermática (Chenoweth y Kastelic, 2007)

Cuando el esperma logra los cambios morfológicos que conducen a su maduración, es almacenado en la cola del epidídimo, manteniendo su capacidad fertilizante y listos para ser eyaculados a través de los tubos deferentes y uretra. Con relación a los factores que controlan esta función de la cola, parece que la menor temperatura de este órgano ejerce una especie de control sobre el almacenamiento, estando también relacionado con la secreción de proteínas específicas. Por otra parte, hay razones para creer que la secreción epididimaria puede tener también influencia durante la capacitación espermática, dado que algunas de estas proteínas se remueven durante el pasaje del espermatozoide por el tracto reproductor femenino.

Por otra parte, es importante destacar que las secreciones del epidídimo están específicamente controladas por los andrógenos.

Podemos concluir que la maduración de los espermatozoides en el epidídimo es un proceso gradual, donde la gameta adquiere primero su motilidad, motilidad progresiva, desarrollando luego su capacidad fecundante (Amann,1991).

.Estructura funcional del espermatozoide: En los mamíferos, la cabeza del espermatozoide, presenta dos elementos predominantes: el núcleo y el acrosoma. La estructura especializada de la gameta masculina, es un reflejo de su actividad funcional. El acrosoma contiene enzimas características, que intervienen en la fertilización, en tanto que el flagelo o cola presenta la fuente de energía y la estructura necesaria para producir la motilidad. La membrana plasmática o plasmalema: de constitución lipídica, cubre toda la superficie espermática y su estructura varía de acuerdo a las diferentes regiones:

-superficie acrosómica.

-segmento ecuatorial, límite entre la superficie acrosómica y la región post acrosomal

-región post-acrosomal.

-cola, la pieza intermedia es la más prominente.

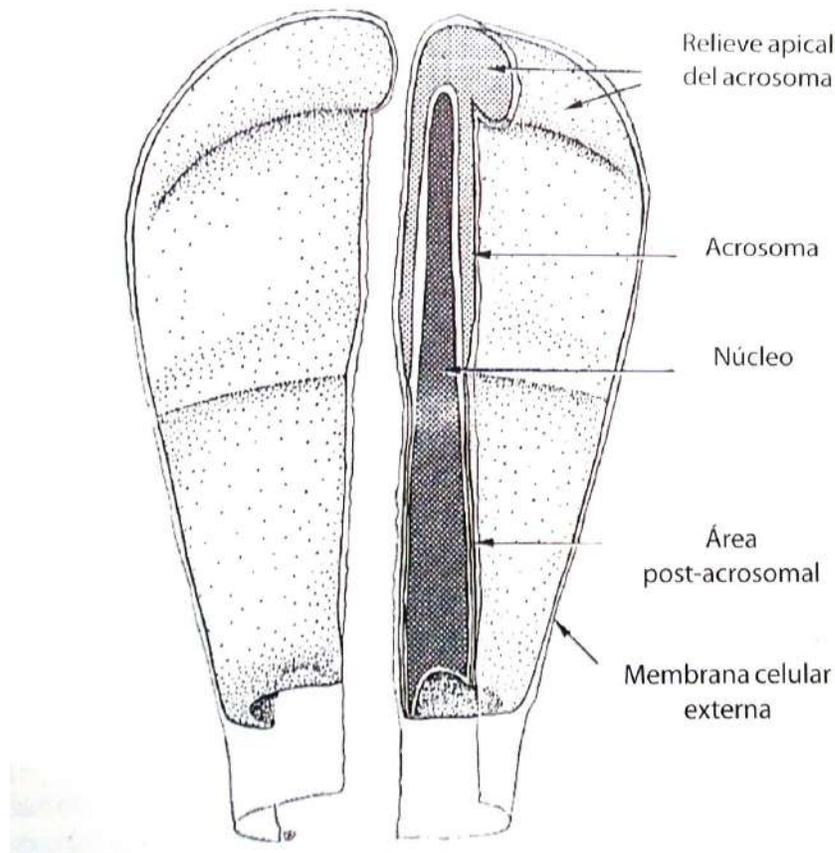
Entre la membrana acrosómica interna, unida a la membrana plasmática, y la membrana acrosómica externa está el contenido acrosómico que contiene la carga enzimática. Las cuales incluyen: hialuronidasa, acrosina, las dos más importantes; esterases, neuraminidasa, fosfatasa ácida, fosfolipasas A y B, arilsulfatasa, colagenasa que actúan en los mecanismos de penetración y fertilización de los ovocitos. Al estudiar el acrosoma, se distinguen dos segmentos:

- acrosoma anterior en su extremo presenta el relieve apical
- segmento ecuatorial.

En relación a los defectos acrosómicos, la hipoplasia y la agenesia del acrosoma, sólo éstos son causas importantes de infertilidad.

En la figura 4, se muestra gráficamente la ultraestructura de la cabeza del espermatozoide, en la cual se observan la membrana celular externa que la recubre por completo, el acrosoma y el núcleo.

Figura 4: Ultraestructura de la cabeza del espermatozoide bovino observada con microscopía electrónica (Saacke, R., 1986)



.Plasma seminal: En general es aceptado que el líquido seminal, producido por las glándulas sexuales accesorias: ampollas de los conductos deferentes, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales o de Cowper, adicionado durante la eyaculación, es un vehículo que estimula el metabolismo del esperma y provee la energía requerida para su pasaje a través del útero. La producción del plasma seminal, regulada por los andrógenos, posee numerosos componentes que incluyen: ácido cítrico, fructosa y otros azúcares libres, glicoproteínas y proteínas (albúmina, globulinas, etc.), fosforilcolina y prostaglandinas. En el toro, el mayor porcentaje del plasma seminal, proviene de las vesículas seminales.

.Migración espermática: En la eyaculación, los espermatozoides maduros que están suspendidos en las secreciones que provienen del testículo y del epidídimo, son transportados a través del conducto deferente hasta el colículo seminal de la uretra donde se suspenden en el plasma seminal.

En el coito bovino, el semen es depositado directamente en el fórnix vaginal y progresa por sus propios medios a través del mucus del cuello, por motilidad espermática. Desde el cuello del útero, es transportado hacia el oviducto, por las contracciones de la musculatura uterina, provocadas por la oxitocina previa sensibilización del miometrio por los estrógenos.

Se cree que sólo los espermatozoides móviles se alojan en las criptas de la mucosa endocervical; los muertos son eliminados, bien por fagocitosis o por el movimiento del mucus cervical hacia la vagina. Luego se puede concluir que el transporte de los espermatozoides por el mucus cervical se divide en tres fases:

- un transporte inicial rápido
- un almacenamiento de las gametas en las criptas
- una fase final de prolongada eliminación.

La duración de esta última no se conoce con exactitud, pero se ha informado de la presencia de espermatozoides con motilidad en el mucus cervical 48 a 72 horas posteriores al coito (Hafez y Hafez, 2008)

Dependiendo de las especies mamíferas, unos pocos cientos o pocos miles de espermatozoides arriban al oviducto a la unión istmo-ampular, el lugar de fertilización del huevo.

En el toro, la fertilidad del esperma puede ser retenida en el tracto genital femenino por no más de 24 horas.

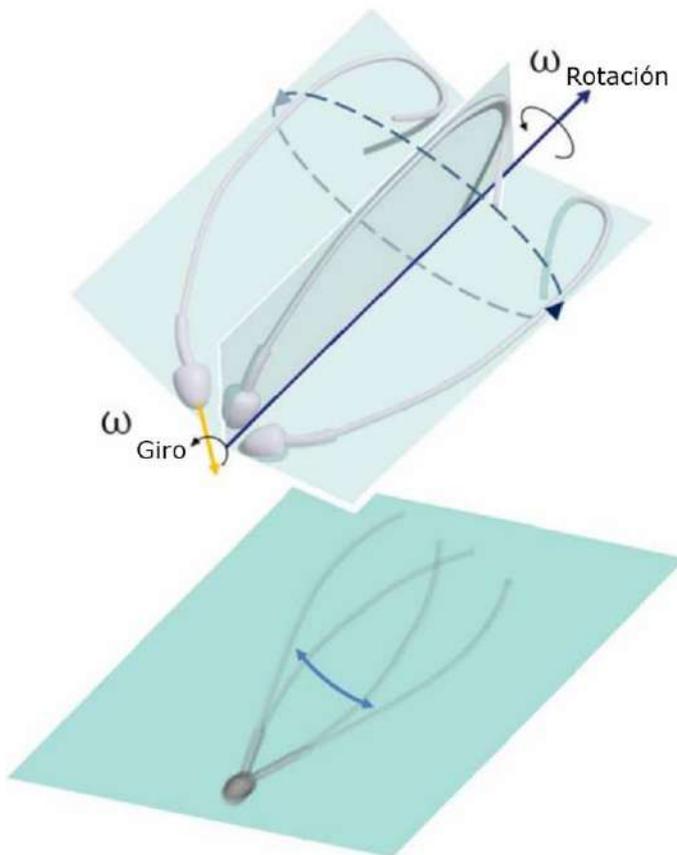
Aunque el tiempo que le lleva alcanzar el sitio de fertilización es de 3-5 minutos, en los mamíferos esta retención está asociada con una marcada reducción de la viabilidad del esperma. En la hembra bovina, el número máximo de esperma se encuentra en el oviducto a partir de las 18 horas post coito.

.Motilidad: El espermatozoide adquiere la capacidad de moverse progresivamente en el epidídimo. Según Calamera, 1992, la motilidad es esencial para que el espermatozoide adquiera la capacidad para efectuar la penetración del cumulus oophorus y la zona pelúcida del óvulo, sin embargo no es indicativa, de por sí, de la actividad fertilizante. Normalmente, el espermatozoide pierde su capacidad fecundante antes de perder la motilidad, gametas morfológicamente anormales pueden tener movimientos normales, aunque son incapaces de fertilizar al óvulo. El ATP es una fuente importante de energía espermática y el ion Ca^{2+} es

fundamental en concentraciones apropiadas, para mantener un perfecto modelo de traslación.

Desde la observación realizada en el siglo XVII, por el científico holandés Leeuwenhoek con un microscopio óptico, no había cambiado el concepto de la forma que se mueve el espermatozoide, hasta las investigaciones realizadas por Gadélha et al, 2020, con microscopía tridimensional. Este grupo de científicos de las Universidades de Bristol en Inglaterra y Nacional Autónoma de México, comprobaron que el movimiento de la cola del espermatozoide no es simétrica hacia ambos lados como se observa en dos planos, con la microscopía convencional 2D. Con la tecnología microscópica en 3D, con una cámara de altísima velocidad que puede grabar 55000 imágenes por segundo, comprobaron que la motilidad progresiva del espermatozoide se percibe como una hélice cónica similar a un sacacorchos. En la parte superior de la figura 5, con la observación en 3D, se aprecia que la motilidad progresiva del espermatozoide se debe a que la cola va girando hacia un lado sobre su eje (flecha azul oscura) y la dirección del giro simultáneo de la cabeza (flecha amarilla). En la parte inferior, se observa la proyección en un plano de la imagen 3D, creando la ilusión óptica del movimiento simétrico bilateral de la cola espermática observada con la microscopía 2D.

Figura 5: Motilidad espermática vista con microscopía 3D y 2D. (Gadélha et al, 2020).



.Capacitación espermática: La capacitación es definida como todos los cambios fisiológicos necesarios que sufre el esperma, en el tracto genital femenino, antes de ser capaz de penetrar al ovocito. Estos cambios en el espermatozoide lo dejan susceptible para la posterior inducción de la reacción acrosomal (RA). En los mamíferos, el tiempo requerido para la capacitación espermática varía entre 1 y 7 horas, según se aprecia en el cuadro 1, dependiendo de las especies y es realizada entre el útero y oviductos, actuando sinérgicamente, por lo que tienen un importante efecto en la capacitación (Hunter, 1987). Los cambios medibles asociados con la capacitación son el alto metabolismo y elevación del oxígeno, incremento de la motilidad, hiperactivación y, la remoción del factor de decapacitación.

Los hipotéticos cambios que ocurren durante la capacitación son: importantes transformaciones de la membrana plasmática, tienen lugar luego de la maduración epididimaria, como la desestabilización y remoción de la sustancia existente en la membrana plasmática, activación de receptores y adquisición de la competencia para poder responder ante otros agentes semejantes a los de la cubierta del ovocito.

Cambios no estructurales en la superficie del esperma, han sido observados durante la capacitación.

Se ha observado, si la célula espermática ha sido capacitada, que puede perder la capacitación al exponerla nuevamente al plasma seminal y, esto se debe a la restitución de los denominados factores de decapacitación que recibe la gameta al pasar por el epidídimo. Es interesante destacar que el mecanismo de la capacitación está influenciado, marcadamente, por el estado hormonal de la hembra, así como del medio al que está expuesto el espermatozoide.

A los cambios mencionados que se producen en la superficie espermática, debemos agregar las modificaciones en el modelo de motilidad de los espermatozoides, o hiperactivación y, los cambios en el estado de las enzimas acrosómicas (Yanagimachi, 1994). Si bien la estructura del acrosoma no varía durante la capacitación, su textura se modifica así como la matriz acrosómica. Por otra parte, se observó también que la estabilidad del núcleo se mantiene invariable durante todo el proceso de capacitación.

De acuerdo con Hunter, la capacitación espermática incluye dos procesos:

- la vesiculación de la membrana en la porción anterior de la cabeza, fenómeno conocido como reacción acrosomal, que permite la liberación de enzimas proteolíticas

- la motilidad hiperactivada, denominado golpe flagelar o latigazo, con lo que adquiere una potencia incisiva de penetración.

Hunter, considera que estos cambios están asociados con la entrada de Ca^{2+} a la célula espermática y con niveles aumentados de AMP cíclico.

Yanagimachi opina que, la capacitación estaría ligada con eventos periovulatorios, de hecho, proteínas específicas del oviducto podrían inhibir la reacción acrosomal y la motilidad hiperactivada hasta poco antes de la ovulación.

Entre los denominados factores de decapacitación, que se remueven de la superficie espermática, están los sulfatos de esteroides. Estos, hacen su aparición, en el tracto reproductor masculino, en el fluido epididimario. Son constituyentes normales del plasma seminal y también forman parte de los espermatozoides.

Por su parte, la esterolesulfatasa es uno de los componentes presentes en el tracto genital femenino y se la considera como un factor de capacitación, dado que interviene enzimáticamente hidrolizando los sulfatos. Otras sustancias del tracto reproductor femenino están también relacionadas con la capacitación. Dentro de las enzimas, mencionaremos a la beta-amilasa, presente en los eosinófilos y, a la beta-glucuronidasa (Yanagimachi).

El espermatozoide inicia la reacción acrosomal (RA) sólo si ha completado el proceso de capacitación. Es decir que dicho fenómeno es imprescindible para que se sucedan otros eventos asociados con la RA y la fusión espermatozoide-óvulo.

Cuadro 1: Valores aproximados del tiempo de capacitación de los espermatozoides de mamíferos “in vivo”. (Hunter, R., 1987).

Especie	Intervalo (horas)
Bovinos	4-5
Ovinos	1-1.5
Porcinos	2-3
Conejos	5-6
Hamster	3-4
Ratas	2-3

.Reacción acrosomal: Cuando un espermatozoide completamente capacitado, se encuentra cerca del sitio de fertilización o entra en contacto con el cumulus ooforus, se inicia la denominada reacción acrosomal.

En la mayoría de las especies la zona pelúcida está rodeada por el cumulus ooforus y el principal componente de su matriz es el ácido hialurónico. La liberación de hialuronidasa por parte del espermatozoide se consideró como la causa de la digestión de la matriz del cumulus. Es posible que los componentes del cumulus sean los responsables de la iniciación de los primeros estadios de la RA.

Por otra parte, cualquier elemento que altere, directa o indirectamente, la permeabilidad de los iones Ca y Na de la membrana plasmática de espermatozoides capacitados, es capaz de comenzar la reacción acrosómica. Es muy importante tener en cuenta que, el ion Ca^{2+} , es esencial para la RA.

Es un hecho incuestionable el pasaje de la gameta masculina por la zona pelúcida, con posterior fusión con la membrana plasmática del ovocito. Por ello se ha descrito, de acuerdo con Yanagimachi, que la RA posee dos funciones primordiales:

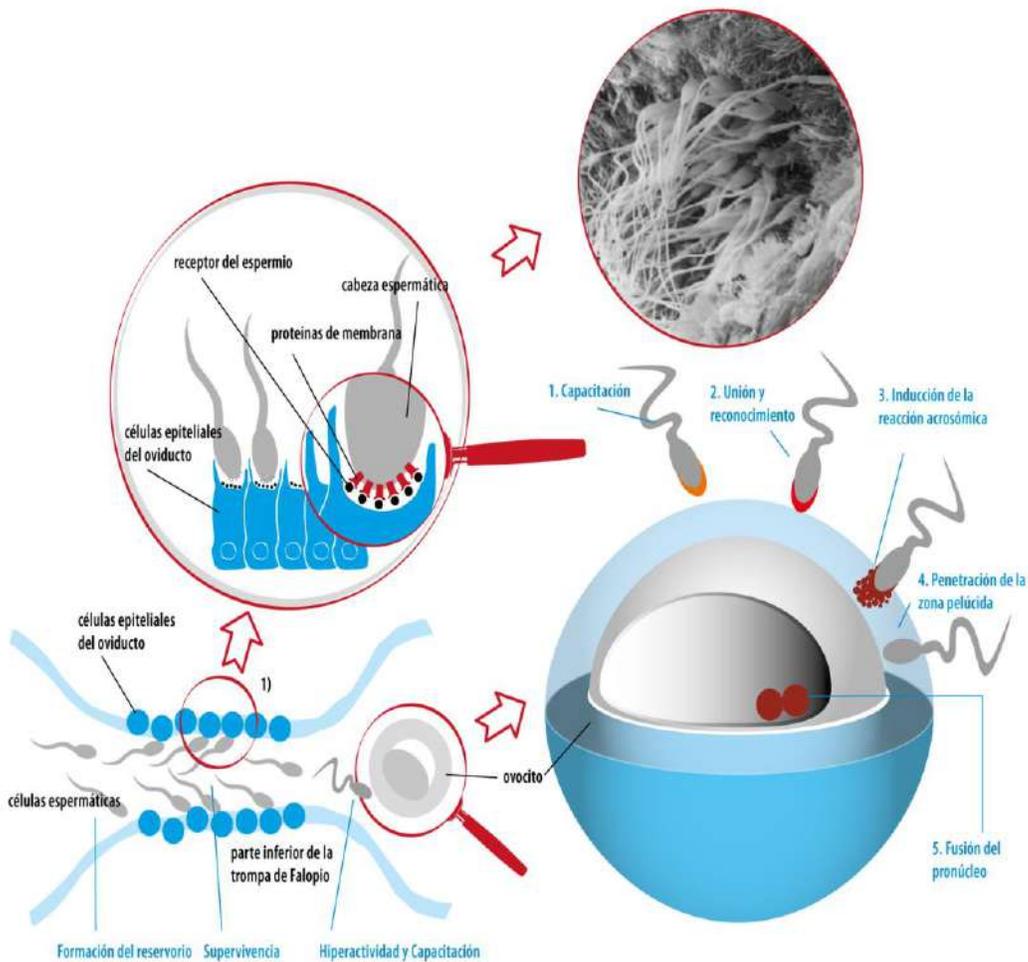
- habilitar al espermatozoide para su pasaje por la zona pelúcida
- la ulterior fusión de la gameta.

En la figura 6, diagramada por Töpfer-Peterson, de la Fundación Tiho-Hannover, citado

por Simmet, 2015, se pueden apreciar en forma esquemática y resumida, los fenómenos biológicos que ocurren desde la llegada de las gametas masculinas al tercio inferior del oviducto: la formación del reservorio espermático, la protección de las células epiteliales de la mucosa oviductal a los espermatozoides, a través del contacto de las proteínas de la membrana celular de los zoides con los receptores espermáticos de las células epiteliales del oviducto, la capacitación, la reacción acrosomal y la fusión de los zoides con el ovocito.

Figura 6: Reservorio espermático, capacitación, reacción acrosomal y fecundación (Töpfer-Peterson, E., citado por Simmet, C., 2015)

Fisiología de la Fertilización



I. Producción de semen

.Obtención de eyaculados de calidad: Teniendo en cuenta que el objetivo de la I.A. es el mejoramiento genético y que éste se logra sembrando material seminal proveniente de toros genéticamente superiores, sobre la mayor población de vientres posible, es de suma importancia extremar los recaudos, siguiendo las pautas de manejo de la NAAB, 2020, con el fin de obtener la mejor calidad de semen en cada uno de los eyaculados que le sean extraídos a los toros seleccionados, con la finalidad de lograr índices adecuados de fertilidad.

Es fundamental y siempre se deberá tener en cuenta en un trabajo de I.A., que la tasa de concepción en rodeos de cría o lecheros, dependerá de tres factores: un componente macho; un componente hembra y un componente humano: el inseminador. Para lograr un correcto resultado en los trabajos de I.A., los reproductores incorporados por su nivel genético a un Centro de I.A. deberán ser sometidos a un estricto y riguroso control andrológico, para poder determinar su capacidad reproductiva potencial. Para ello, el manejo de rutina que realicemos con los toros será fundamental, dado que, obteniendo eyaculados óptimos en lo que hace a su calidad se logrará:

- mayor volumen
- mayor concentración espermática
- mayor porcentaje de espermatozoides con adecuado vigor
- mayor porcentaje de células morfológicamente normales
- menor contaminación bacteriana

En consecuencia, con un correcto manejo, se garantizan las condiciones de maximizar la producción de dosis de semen de cada uno de los reproductores, obteniendo una excelente materia prima a partir del material seminal eyaculado. (Amann, 1986)

Lógicamente, un Centro de I.A. no sólo debe producir un material seminal con una fertilidad potencial adecuada, sino también nos debe garantizar un alto nivel de control sanitario de los reproductores, un correcto nivel de higiene, calidad bacteriológica en el trabajo del laboratorio y, una muy buena identificación del semen producido. Para obtener eyaculados de calidad, es fundamental controlar los numerosos factores que interactúan en esta actividad, entre los cuales se describen:

.Personal: “El personal encargado del cuidado de los toros y de la recolección de su semen, es el grupo más importante dentro de los empleados de una organización de I.A.”, tal lo expresado por Amann, 1990. En un Centro de I.A., el equipo de recolectar semen es el responsable de obtener el máximo número de espermatozoides de alta calidad, especialmente en los reproductores de mayor demanda. El mismo debe ser evaluado, calculando el número de espermatozoides colectados de un toro, durante un período determinado (Foote, 1978). Sin duda que la clave de una alta calidad de los eyaculados obtenidos está en la motivación del personal que maneja los toros. Para realizar un eficiente trabajo de extracción de semen, se realizará un correcto trabajo de excitación pre-coital, para lo cual es necesario contar con un equipo integrado, como mínimo, por tres personas perfectamente entrenadas: una, para el manejo del toro a colectar; otra, para manejar el súcubo o monta y una tercera, responsable de la extracción con vagina artificial (V.A.). Esta persona es también la que tiene que desviar el pene del reproductor cuando éste realiza la “falsa monta”, durante el trabajo de excitación pre-coital.

Generalmente y por razones sanitarias, se utilizan como súbucos toros mansos, integrantes del plantel de toros del Centro de I.A., habilitados por SENASA, y siempre deberán tener un tamaño similar al toro al que se le va a extraer el semen. En Europa, es frecuente el uso de súbucos mecánicos, sumamente versátiles, como reemplazo de montas naturales, toros enteros o toros castrados, hembras. Se estima que el 45% de los reproductores acepta al súbucos artificial. Asimismo, en EE.UU. se utilizan toros castrados, bueyes, por su mansedumbre, como súbucos en la tarea de extracción de semen. (Amann, 1990)

.Controles sanitarios: Las pruebas sanitarias a las que están sometidos los toros residentes, habilitados por el SENASA, en un Centro de Inseminación Artificial son las exigidas por la Ley de Fiscalización de las actividades para desarrollar y ejecutar los métodos de I.A. n° 20.425 – Decreto Reglamentario n° 4.678 y otras que pueda exigir el propio Centro de I.A. Por la ley 20.425, el SENASA exige el control semestral de las siguientes enfermedades relacionadas con la reproducción animal:

- Tuberculosis
- Brucelosis
- Tricomoniasis
- Leptospirosis
- Campylobacteriosis

En general, las organizaciones productoras de semen, al examen clínico del toro, adicionan controles sanitarios sobre otras enfermedades no incluidas en la ley, a las que se le podrán agregar las que pueda exigir el país importador del material seminal:

- Leucosis Bovina Enzootica (BLV)
- Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR)
- Diarrea Viral Bovina (BVD)
- Paratuberculosis
- Lengua Azul
- Neospora

.Preparación higiénica del toro: La rutina a desarrollar comprende los siguientes pasos:

-Proceder, en el día previo a la extracción de semen, a efectuar el baño de los reproductores, si las condiciones climáticas lo permiten y, a su posterior ubicación para pernoctar en un lugar cerrado “*ad hoc*”, con el fin de crear un reflejo condicionado o pavloviano, por medio del cual el toro asocia que, luego del baño y del encierro, al día siguiente desarrollará actividad sexual. Con esta simple práctica, la calidad del eyaculado, mejora en forma notoria, básicamente en lo que hace a volumen y concentración espermática, con respecto a una práctica similar, pero suprimiendo la etapa comentada, en la que el toro es llevado directamente, desde su corral o piquete al lugar de extracción.

-En el día de trabajo y previo a la extracción de semen, es fundamental hacer a todos los toros incluidos en el programa, un control del estado higiénico en que se encuentra la zona genital de los mismos. De ser necesario, se podrá realizar un lavaje prepucial, con solución

fisiológica, a los efectos de eliminar la mayor cantidad posible de cuerpos extraños, detritus, etc. y proceder al recorte de pelos alrededor del orificio del prepucio.

.Instalaciones: El lugar de extracción o sala de colecta (“galpón de salto”), debe ser un ambiente cerrado pero con ventilación adecuada y debe poseer un piso blando, mezcla de arena-tierra, caucho u otras alternativas, a fin de prevenir a los toros de lesiones en sus miembros posteriores, factibles de ser producidas en pisos duros como consecuencia del salto que realiza el reproductor, en el momento de dar la “estocada”, al eyacular. Contará con bretes para contener los súcubos, ubicados en diferentes lugares a fin de mantener el interés sexual del toro a lo largo del año, rotándolos de súcubo y brete, periódicamente. Asimismo, es conveniente contar con un brete móvil o portátil para utilizarlo, cuando las condiciones del clima lo permiten, en aquellos toros que muestran un mejor comportamiento si se los trabaja al aire libre.

La sala de colecta debe estar rodeada, en todo su perímetro, de una valla de seguridad para brindar protección al personal que maneja los reproductores. También incluye un lugar donde los toros, ubicados de frente, aguardan su turno observando a los otros toros como son colectados. El toro, generalmente, es atraído por la visión de la actividad de monta de sus congéneres. Las pautas visuales tienden a ser de mayor importancia como estimulante sexual, que el olfato o las pautas auditivas.

La sala de colecta debe ser de fácil limpieza, la que deberá efectuarse con posterioridad a cada día de producción y ser desinfectada semanalmente.

.Producción diaria de esperma y producción total: La producción diaria de semen se refiere, por lo general, al número de espermatozoides colectados por vagina artificial (V.A.) o electroeyaculación (E.E.) de animales de los que se obtienen eyaculados con frecuencia. Los que eyaculan con asiduidad evitan que se les tenga que calcular las reservas almacenadas de esperma en la cola epididimal y se reduce la pérdida de semen por reabsorción en los conductos eferentes, dado que tienen la propiedad de fagocitar esperma, también por la eliminación por la orina y la masturbación. La producción diaria de esperma denota el número de espermatozoides formados en los testículos y no está afectada por las causas mencionadas de pérdida.

.Frecuencia en las extracciones: Generalmente, el ritmo de las extracciones de semen de un toro, en un Centro de I.A. es de dos eyaculados un par de veces a la semana y dependerá, fundamentalmente de:

-la capacidad de producción de semen, propia de cada reproductor

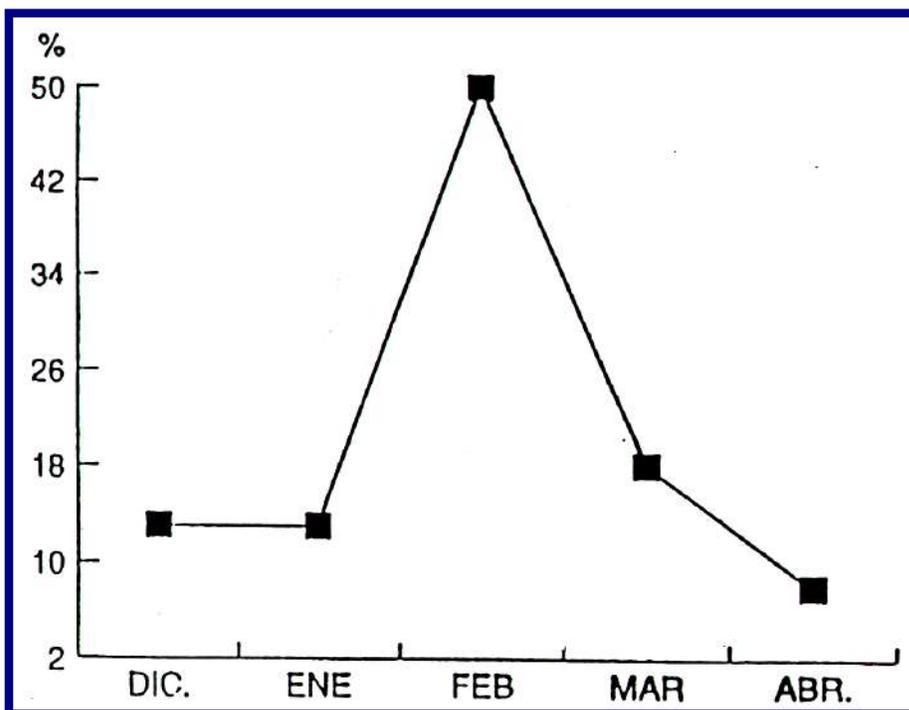
-demanda comercial de su material seminal.

Es importante determinar la frecuencia de las extracciones a los toros, teniendo en cuenta su edad y estado físico. Aumentando la frecuencia de los eyaculados, disminuyen el volumen y la concentración espermática por eyaculado y se puede observar un pequeño incremento en el porcentaje de espermatozoides vivos. Lo ideal, en el manejo de los toros, es maximizar la producción de semen mientras minimizamos la tarea requerida para ello. Almquist y Foster, citados por Foote, 1978, utilizando toros de razas carniceras, observaron que en siete sucesivos eyaculados realizados en una jornada de extracción, hubo una

significativa disminución en la concentración espermática, en el número total de espermatozoides por eyaculado, pero si bien había una reducción no había cambios significativos en el volumen.

.Infertilidad de verano, otras situaciones de stress y alimentación: Las altas temperaturas ambientales tienen un efecto negativo directo sobre los mecanismos de termorregulación testicular y, por consiguiente, sobre la espermatogénesis. Para poder realizar una espermatogénesis normal, el testículo requiere, una temperatura de 4 a 5°C inferior a la corporal (Coulter y Kastelic, 1994). Cuando la temperatura ambiente es superior a los 33-34°C, imposibilita al escroto de efectuar una correcta función de termorregulación, la que normalmente es realizada por medio del músculo cremáster, las fibras dartoicas, túnica dartos y, la importante vascularización de esa zona. Una elevada temperatura intratesticular, en el verano o producida experimentalmente, incrementa considerablemente el nivel de degeneración de las células germinales. Esto se evidencia por la disminución del número de espermatozoides eyaculados y un incremento notorio en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales. Luego, a medida que las condiciones climáticas se van normalizando, se revierte este proceso y se reinicia, progresivamente, una correcta espermatogénesis. La completa normalización de la calidad del semen eyaculado se podrá apreciar a los 60 días, aproximadamente, posteriores al comienzo de la disminución de la temperatura diaria (Chenoweth y Kastelic). Para toros Holando, se puede observar en la figura 7, un incremento significativo de las anomalías espermáticas en los meses de verano, con su posterior regreso a la normalidad en el otoño

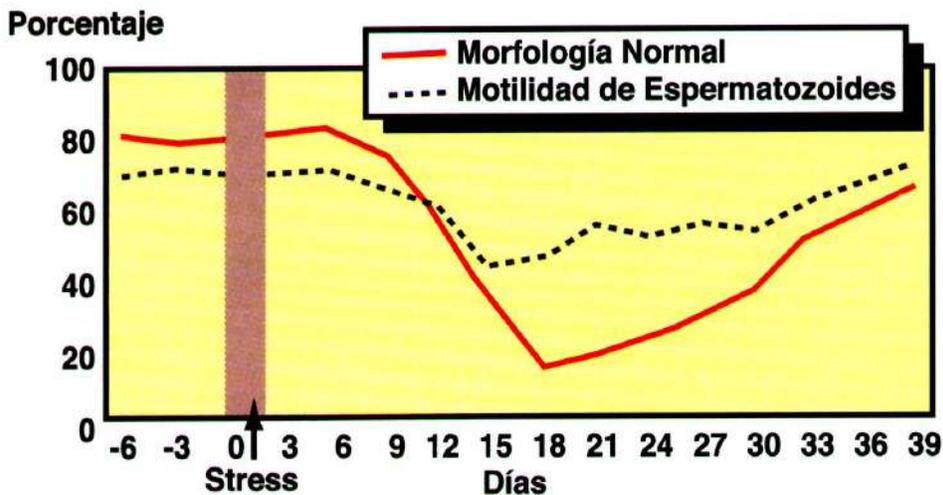
Figura 7: Variación mensual de las anomalías espermáticas en toros Holando



Sekoni y Gustafsson, 1989, observaron que el rango en la incidencia de anomalías de la cabeza fue de 1,34% en primavera a 3,72% en el verano ($P < 0.04$). Además, comprobaron que la presencia de gotas citoplasmáticas proximales, varió de 1,96% en el invierno a 3,08% en verano ($P < 0.02$). No encontraron diferencias significativas en la observación de gotas citoplasmáticas distales cuyo rango fue de 1,54% para el invierno y 2,33% para la primavera. Lo mismo ocurrió con las anomalías de la cola cuya incidencia promedió 2,91% en primavera y 4,60% en el verano. El total de anomalías espermáticas que observaron varió de 11,21% en el otoño a 14,84% en el verano ($P < 0.04$).

En la figura 8 se indica como un stress térmico, sufrido en un corto período de 48 horas al alterar las distintas etapas de la espermatogénesis, afecta la calidad del semen referida a la morfología y a la motilidad espermática por un período que supera los 45 días.

Figura 8: Efecto del stress calórico sobre la calidad del semen (Dejarnette, M., 2000)



Esta “infertilidad de verano”, entidad perfectamente determinada y de carácter reversible, afecta en mayor grado a los toros de razas carniceras británicas que a las razas continentales europeas e índicas. En el cuadro 2, se brinda información al respecto, detallando la evaluación de 33515 eyaculados, recolectados en CIAVT durante un período de diez años, considerando la raza y la época del año. También se indica, para cada raza, el rango entre los meses de mayor y menor descarte de material seminal expresado en el porcentaje referido al total de eyaculados recolectados. Las cifras, son muy variables, entre razas y estación del año. La Holando es la que, en promedio, presenta una superior calidad con respecto a las Angus y Polled Hereford y en menor medida con las índicas. También, se desprende del cuadro 2 para las tres razas de toros Bos taurus, que el efecto detrimental en la calidad seminal se obtiene en los meses de enero-febrero. En las figuras 9,10 y 11, se aprecia gráficamente la amplitud de las diferencias entre razas, en relación al total de eyaculados recolectados, respecto a su aprobación para congelar y con posterioridad al congelamiento. En los reproductores Polled Hereford, se observa el rango más amplio entre los meses de mayor y menor calidad de semen respecto al momento de la recolección del eyaculado y su aptitud para el congelamiento.

Cuadro 2: Evaluación de la calidad seminal considerando la raza y la época de recolección

RAZA	Eyaculados Totales	Eyaculados Aprobados	%	Cong. Aprob./ Eyac. Aprob.	%	Cong. Aprob./ Eyac. Totales	%
H.A.	19.157	15.033 (+)Febrero Junio	78 68 85	12.929 febrero Setiembre	86 65 92	12.929 Febrero Junio	67 45 76
A.A.	6.035	4.333 Febrero Julio	72 63 76	3.143 Febrero Junio	73 51 80	3.143 Febrero Junio	52 32 60
P.Hd.	5.494	3.539 Enero Setiembr.	64 43 75	2.564 Enero Agosto	72 40 84	2.564 Enero Setiembre	47 18 62
Ind.	2.829	2.049 Abril Noviemb.	72 59 79	1.630 Marzo Agosto	79 69 89	1.630 Abril Junio	58 42 70
Tot.	33.515	24.954	74	20.266	81	20.266	60

Figura 9: Porcentaje de eyaculados aprobados para su congelamiento y amplitud de las diferencias entre los meses de mayor y menor descarte considerando la raza

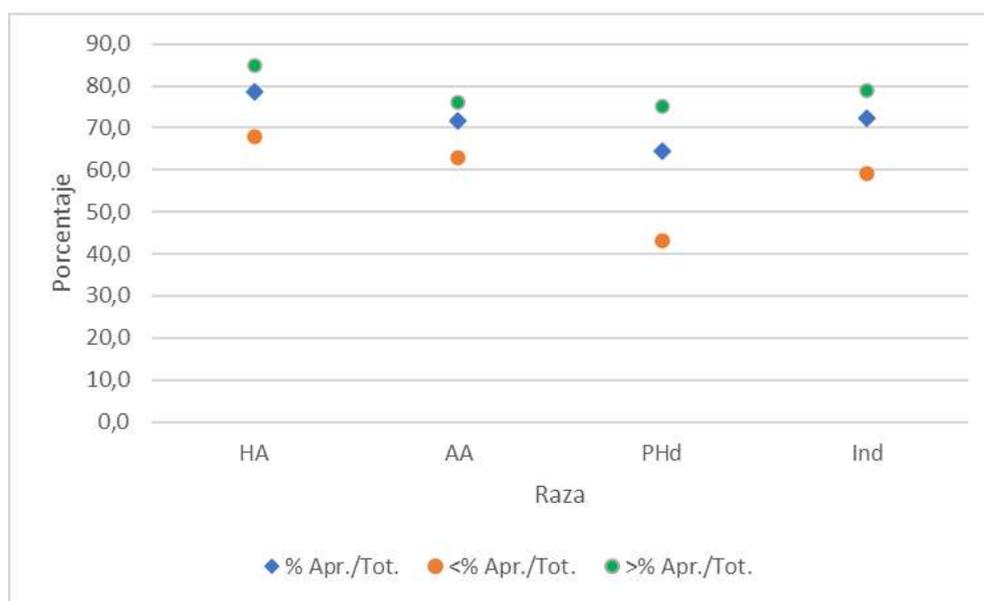


Figura 10: Porcentaje de eyaculados congelados aprobados, en relación a los aptos para el congelamiento y, la amplitud de las diferencias entre los meses de mayor y menor descarte considerando la raza

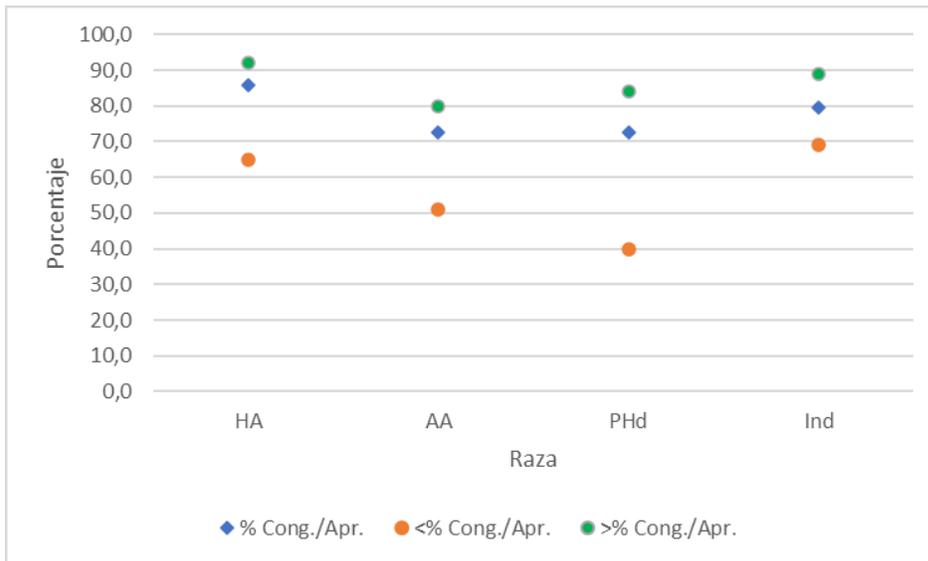
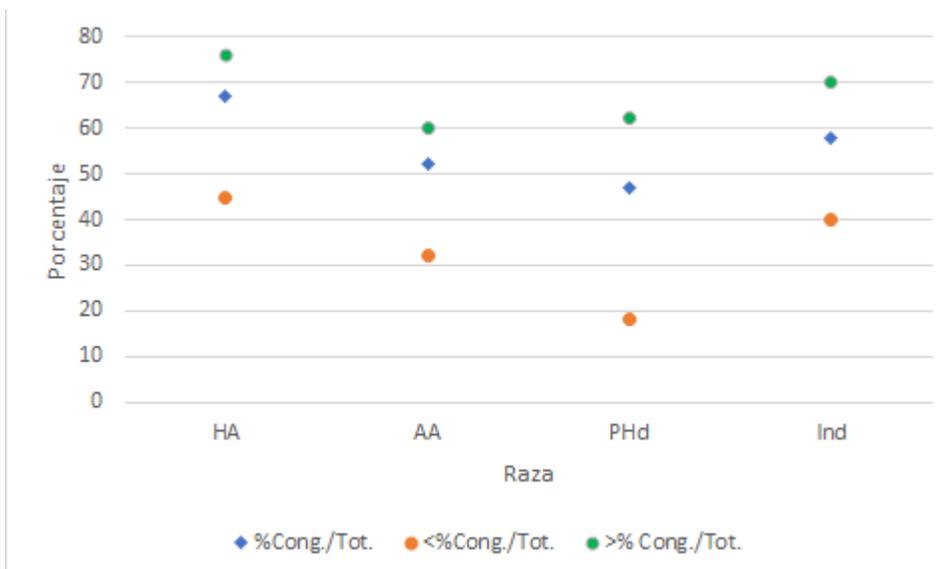


Figura 11: Porcentaje de eyaculados congelados aprobados, en relación al total de recolectados y, la amplitud de las diferencias entre los meses de mayor y menor descarte considerando la raza



Los reproductores *Bos taurus*, son más sensibles a los efectos detrimentales de las altas temperaturas sobre la espermatogénesis, que los *Bos indicus* y sus cruza (Skinner y Louw, citados por Kastelic, J., 2001)

Durante el mes de febrero, en el hemisferio sur, se produce el semen de menor calidad dado la influencia de la alta temperatura ambiental registrada en los meses de diciembre y enero. En términos generales, hay un bajo porcentaje de descarte, tanto de eyaculados como de semen congelado entre otoño a fin de primavera. Al finalizar esta estación del año, comienza a decrecer la calidad del semen, aumentando paralelamente el porcentaje de material seminal descartado (Everett y Bean, 1982).

Como se explicó con anterioridad, el efecto de la alta temperatura ambiental afecta la morfología espermática, caracterizadas por cabezas, sueltas, piriformes, colas dobladas, gotas citoplasmáticas proximales y una disminución significativa en el número total de espermatozoides y en la concentración espermática e inclusive una marcada reducción de la motilidad. Es importante destacar que cuando aumenta la temperatura testicular, prescindiendo de la causa, la morfología espermática no es afectada inicialmente por un período de 8 a 11 días, que corresponde al recorrido de los espermatozoides por el epidídimo. En consecuencia, es fundamental tener en cuenta que, todos los eyaculados en el momento de su recolección son una foto instantánea de un proceso que comenzó 60 días atrás, dado el período de la espermatogénesis y el lapso del tránsito epididimal (Romano y Brinsko, 2020).

Aún, ante leves aumentos de la temperatura testicular de tan solo 0,5 °C, son suficientes para causar un importante disturbio en la espermatogénesis. Normalmente la temperatura del testículo del bovino es mantenida, muy próxima a los 34,5 °C, por el enfriamiento que realiza el plexo pampiniforme por un mecanismo de contracorriente a través de su longitud de 3,5 a 4,5 metros envolviendo a la arteria testicular. También, es muy importante la piel que recubre el cono vascular del testículo, por ser un lugar muy importante de pérdida de calor, al tener un espesor muy delgado, relativamente desprovista de pelos y con una extensa vascularización que por medio de la vasodilatación incrementa la pérdida de calor. El engrosamiento de la piel, en el cono vascular, afecta esta función (Chenoweth y Kastelic, 2007). Al elevarse la temperatura intratesticular, se provoca un aumento del metabolismo y una mayor demanda de oxígeno, sin el incremento correspondiente del flujo sanguíneo lo que ocasiona la hipoxia testicular, dado que los testículos de los mamíferos trabajan al borde de la hipoxia. Barth, 1991, ejemplifica este fenómeno biológico, con el siguiente hecho histórico: en el año 1535 la capital de Perú fue trasladada, de Juana ubicada a 3507 metros de altura, a Lima a nivel del mar porque ninguna persona foránea o mamíferos exóticos podían reproducirse. En Potosí, Bolivia, ubicada a 4070 metros, durante un lapso de 53 años posteriores a su fundación por los españoles, no nació ningún niño. Rizzoto y Kastelic, 2020, han cuestionado el concepto que la hipoxia es la causa subyacente, en los cambios producidos en la morfología espermática inducidos por el calor. En primer lugar, aseguran que hay muy pocos y a su vez limitados datos experimentales que de soporte científico a este paradigma. En segundo término, a través de los datos obtenidos en un estudio factorial 2 x 3, en el cual carneros y ratones fueron expuestos a dos valores de temperatura, alta y normal, además simultáneamente, a tres concentraciones de oxígeno en el aire inspirado, hiperoxia, normoxia e hipoxia. Como se esperaba, el aumento de la temperatura, tuvo un efecto detrimental sobre la motilidad y la morfología espermática. Sin embargo, la hiperoxia no previno estos daños y tampoco la hipoxia los replicó. En tercer

lugar, en dos estudios posteriores los carneros anestesiados, fueron secuencialmente expuestos a tres concentraciones de oxígeno, 100, 21 y 13 % o tres temperaturas testiculares, 33, 37 y 40°C. A medida que el oxígeno descendió, los testículos mantuvieron su suministro por aumento del flujo sanguíneo y de su extracción. Además, a medida que la temperatura testicular aumentó, la actividad metabólica prácticamente se duplicó, pero el incremento del flujo sanguíneo y de la extracción de oxígeno no indicaron un metabolismo anaeróbico. Con estos trabajos y otros mencionados en la bibliografía que presentaron, concluyen rechazando el paradigma que la hipertermia testicular falla para aumentar el flujo sanguíneo y que la hipoxia resultante altera la espermatogénesis.

Por otra parte, ante un problema de obesidad en el toro, se depositan excesos de grasa en el cuello del escroto, grasa periescrotal, evitando el intercambio normal de calor, resultando en una espermatogénesis anormal y la posibilidad de una degeneración testicular.

Además, aún después de haber cambiado a una dieta controlada de bajo nivel energético, los toros que previamente estuvieron sobrealimentados, continúan produciendo semen de baja calidad por un largo período. La gran deposición de grasa alrededor del cono vascular testicular, en el cuello del escroto, es mucho más difícil de eliminar que en otras partes del cuerpo, aunque los machos dadores de semen tengan una considerable pérdida de peso (Brito, et al, 2002). En los Holando, produciendo material seminal en los Centros de I.A., las dietas de alto nivel energético están asociadas con enfermedades podales (Mathevon et al, 1998). Otro factor relacionado con los trastornos en la espermatogénesis ocasionados por errores en la formulación de raciones, fue observado por Chenoweth et al, 1994, en toros jóvenes de raza Brahman, que durante doce semanas recibieron una ración diaria, con semilla de algodón que contenía 8,2 g de gosipol. A partir de los 35 días, observaron una significativa disminución de la motilidad espermática y, con posterioridad a la novena semana, disminuyó significativamente el porcentaje de espermatozoides vivos.

En animales de laboratorio y en el hombre, se describe a la interacción testosterona-leptina como parte del eje hipotálamo-hipofiso-testicular-tejido adiposo que regula el peso corporal y la función reproductiva. La leptina producida por los adipocitos, a niveles fisiológicos normales, estimula en el hipotálamo la liberación de GnRH y por consecuencia en la hipófisis la síntesis y descarga de LH y FSH. La respuesta también puede ser inhibitoria de acuerdo al estado nutricional del animal, dado que en los animales obesos los niveles significativamente altos de leptina inhiben la testosterona (Tena-Sempere y Barreiro; El Hefnawy, et al, citados por Quintero y Ruiz Cortés, 2011). Sin embargo, en trabajos desarrollados por Brito, 2015a, no se encontró relación entre los pulsos de LH y las concentraciones de leptina e insulina, en toros de razas carniceras bajo diferentes planos de nutrición. Otros estudios también han demostrado, que la leptina no estimula in vitro la secreción de GnRH por explantes hipotalámicos, o la secreción de gonadotrofinas por células hipofisarias extraídas de toros o novillos, mantenidos en un adecuado nivel de nutrición (Amstalden et al, citados por Brito, 2015a). Estos trabajos indicarían que el rol de la leptina e insulina en la secreción de la GnRH, si lo hubiera, podría ser puramente permisivo en los toros.

Es muy importante, tener presente como causas comunes de stress, a las afecciones del esqueleto axil y del apendicular, que provocan dolor, artritis, abscesos podales, laminitis, u otros agentes traumáticos. En esta situación, los altos niveles de cortisol afectan significativamente los valores séricos de LH y por consiguiente al reducirse la testosterona circulante e intra testicular se producen trastornos en las diferentes etapas de la espermatogénesis (Barth y Bowman, 1994).

II. Evaluación de la calidad seminal

La valoración de la calidad seminal para estimar la capacidad fecundante potencial de un eyaculado o la del reproductor que se colectó, es un importante indicador para optimizar los resultados de un programa de inseminación artificial (I.A.) a instaurar, como así también, como control de la eficiencia del trabajo de procesado de semen por parte del Centro de I.A. No obstante, es importante destacar que la estimación de la fertilidad mediante un simple análisis “in vitro”, es todavía incierto debido a las diferencias entre los resultados del laboratorio y los resultados de fertilidad obtenidos in vivo en el campo.

La valoración del semen se efectúa en dos partes, perfectamente diferenciadas, la efectuada en el semen eyaculado y la realizada en el criopreservado.

-Valoración del semen eyaculado: La consideración de ciertos parámetros facultará para decidir el destino del eyaculado. Es decir, si cualitativamente el material seminal analizado, a través de evaluaciones macroscópicas y microscópicas, está en condiciones de ser procesado.

Evaluación macroscópica:

.Volumen: Es conveniente estimarlo en base al peso, dado que la exactitud de la lectura directa en el tubo graduado, está afectada por la espuma y la imprecisión de la graduación (Decuadro-Hansen, 2000).

Se trata de un parámetro sumamente variable, tanto en individuos de una misma raza, como así también, entre reproductores de diferentes razas. Está influenciado por los siguientes factores:

-Edad: Los volúmenes máximos corresponden a toros comprendidos entre los 5 y los 9 años de edad, siendo a los 9 años cuando producen el mayor volumen o volumen pico. Asimismo, se conviene en que a los 4 años se obtiene el pico de producción espermática y el total de zoides por eyaculado. Los toros adultos tienen eyaculados de mayor volumen, más alta concentración espermática y en consecuencia más elevada producción de espermatozoides totales (Snoj et al, 2013; Brito et al, 2002; Murphy et al, 2018). Se piensa, que la calidad del eyaculado mejora con la edad, por cambios fisiológicos tales como el aumento en la masa muscular, el simultáneo desarrollo de los testículos y las glándulas sexuales accesorias a través de un aumento en la actividad del eje hipotálamo-hipofisotesticular. Por lo tanto, el mejoramiento cualitativo del eyaculado se correlaciona positivamente con la madurez sexual, que continúa desarrollándose más allá de los cinco años posteriores a la pubertad.

La edad del toro, al momento de la recolección, fue evaluado por Brito et al, realizando un relevamiento en tres Centros de I.A de Brasil durante tres años. En general, tanto el volumen del eyaculado, la cantidad total y el número de espermatozoides viables, aumentaron con el transcurso de la edad en los *Bos taurus* y *Bos indicus* ($P < 0.05$). En los reproductores de razas índicas y sus cruza, observaron una concentración espermática más elevada y significativamente, un mayor porcentaje de defectos morfológicos.

Con el advenimiento de la selección genómica obliga, a las organizaciones productoras de material seminal, a incorporar toritos muy jóvenes e iniciar la recolección del semen antes

del año de edad. Murphy et al, 2018, durante un lapso de cuatro años, analizaron 8983 eyaculados obtenidos de 176 toros Holstein Friesian. Concluyeron, que el volumen del eyaculado recolectado aumenta con la edad, con una correlación positiva de ($r= 0.62$; $P < 0.01$) y un incremento aproximado de 0.5 ml por cada año de aumento en el segmento etario.

-Trabajo de excitación pre-coital (Regla: XXRX): En la rutina de trabajo de la sala de colecta, recomendada por Decuadro-Hansen, se debe inducir al reproductor para que realice tres “falsas montas”. Las dos primeras (XXRX) deberán ser efectuadas sobre el súcubo sin que el operador porte la vagina artificial (V.A.) en sus manos. Luego se retira el toro durante dos minutos, pero manteniéndolo en reposo activo (XXRX), a los fines que no disminuya el nivel de estímulo alcanzado. Durante este corto período, el operario o “vaginero” debe controlar la temperatura de la V.A. y retirar la misma del laboratorio. Transcurrido ese tiempo y con la V.A. en manos del operador, se le permite al toro realizar una falsa monta más (XXRX). El eyaculado será colectado con la V.A. recién en el cuarto intento, siempre que el toro monte bien perfilado y mantenga su pene erecto.

El objetivo de estas maniobras es lograr que el toro eyacule en el momento más apropiado, el que será determinado por el “vaginero”, y no cuando el reproductor lo desea.

Esta técnica de preparación sexual, retrayendo al toro y permitiendo sólo montas falsas, influye en forma positiva en la obtención del semen como se aprecia en el cuadro 3. En este estudio, realizado en toros Holando por Hafs, et al, y citado por Foote, 1978, se observa el efecto aditivo de las falsas montas y el tiempo dedicado a la preparación del macho dador, en el incremento de la cantidad de espermatozoides recolectados por eyaculado.

Es importante destacar que, los toros de razas carniceras *Bos taurus* y *Bos indicus*, requieren más tiempo que los Holando para prepararlos sexualmente.

Cuadro 3: Preparación sexual y su efecto sobre la recolección de eyaculados (Hafs, et al citados por Foote, 1978).

Cantidad de falsas montas	Tiempo destinado a la preparación sexual (minutos)		
	0	5	10
(Miles de millones de espermatozoides por eyaculado)			
0	7.0	14.1	16.2
1	11.7	13.8	16.8
2	14.2	15.1	15.0
3	13.5	17.4	19.6

Para realizar una tarea correcta es necesario utilizar conocimientos fisiológicos de la cadena de reflejos sexuales, como ejemplo se citan al reflejo de Flehmen: reversión del labio superior y la conducta del animal, así como observar e interpretar las diferentes reacciones y deseos de cada macho dador.

Entre las dos extracciones de eyaculados a cada toro, es importante dejar un período de descanso de 15 a 20 minutos.

-Método de recolección del semen: En general se puede afirmar que, el semen obtenido por medio de la V.A. es de menor volumen y mayor concentración espermática que el que se logra mediante la técnica de la electro-eyaculación (E.E.) de R.M.G. Gunn desarrollada en 1932.

En 1934, F. Miller y E. Evans describen otra alternativa de técnica de colecta de semen mediante el masaje rectal con estímulo de las vesículas seminales y ampollas de conductos deferentes.

-Época del año: Pese que, a partir de una temperatura ambiente de 30°C, se produce una sensible merma en la calidad de los eyaculados, el volumen promedio para tres razas, Holando, Aberdeen Angus y Polled Hereford se incrementó en los meses más cálidos. Se han obtenido, en promedio, 5.80 cc para el semestre abril-setiembre y 6.05 ml desde octubre a marzo. Estos resultados coinciden con el trabajo desarrollado por Snoj et al, 2013, que por medio de un estudio retrospectivo evaluaron 71983 eyaculados de toros *Bos taurus* de cuatro razas diferentes. Comprobaron que la concentración espermática no varió significativamente durante las diferentes estaciones del año. Por el contrario, el volumen del eyaculado y la cantidad de espermatozoides recolectados estaban influenciados en todas las razas, por la época en que se produce la colecta. El mayor volumen y la cantidad total de células espermáticas se obtuvo en el verano decreciendo gradualmente en la primavera, el otoño y el invierno. Snoj et al, sugieren que el aumento gradual en las horas de luz que ocurren en la primavera, sería la principal razón de la mayor producción de semen en el verano.

-Día de la semana: Los toros de un Centro de I.A. están expuestos a diversos estímulos o condiciones ambientales que pueden tener influencia sobre la producción de semen, las más importantes se detallan a continuación:

.Interacción social entre los integrantes del equipo de colecta: Es alta al inicio de la semana, fundamentalmente comentarios sobre resultados deportivos ocurridos el sábado y domingo e invariablemente baja al final de la semana.

.Inactividad del fin de semana: la falta de una actividad normal y de manejo de los toros en los días sábado y domingo, pueden tener un efecto negativo sobre el primer día de reinicio de las tareas de recolección. Pese a que se pueda pensar lo contrario, dado que el equipo de producción se reintegra al trabajo luego del descanso del fin de semana, en el cuadro 4 se indican las mejoras cuantitativas que se logran en los eyaculados recolectados los días jueves y viernes.

En conclusión, si bien se han detectado cambios en la producción de semen con la variable día de la semana, no ha podido determinarse si son por efecto del toro o influenciado por el equipo de colección de semen.

Cuadro 4: Características cuantitativas del eyaculado considerando el día de recolección (Everett y Bean, 1982)

Día de la Semana	Vol. Eyacul. (ml)	Concentr. Esp./ml (millones)	Zoides totales eyacul. (millones)
Lunes	7.64	1.210	9.244
Martes	7.83	1.220	9.552
Miércoles	7.29	1.220	8.894
Jueves	7.84	1.250	9.800
Viernes	7.84	1.300	10.192

-Cantidad de reproductores: un programa de producción de pocos toros no necesariamente incrementa la eficiencia o la calidad del trabajo del equipo de colecta. Por el contrario, se ha observado cierta relajación en el grupo, cuando en la programación semanal de saltos, se reduce significativamente en un día determinado la cantidad de toros.

-Raza: Los toros de raza Holando producen mayor volumen de semen, en sus eyaculados, que los de razas británicas de carne, tal como se puede apreciar en el cuadro 5, de acuerdo a los registros de 2378 eyaculados recolectados en CIAVT.

Cuadro 5: Volúmenes del eyaculado en diferentes razas bovinas.

Razas	Volumen del eyaculado (ml)
Holando	6.64
Aberdeen Angus	5.63
Polled Hereford	5.41

También, los Holando producen eyaculados de más volumen que otras razas carniceras continentales, razas sintéticas e índicas.

-Circunferencia escrotal (CE): La medida de CE está altamente correlacionada con el peso de los testículos, y el peso de éstos, a su vez, lo está directamente correlacionado con la capacidad de producción diaria de esperma con rasgos de buena calidad seminal y

fertilidad. Nos permite predecir, en toros en crecimiento, la capacidad potencial de los mismos en lo referente a calidad seminal. La correlación es alta y positiva. La CE está relacionada con la edad y el peso del animal, dado que a mayor peso y edad el volumen de los testículos tiene que ser mayor. Un toro que presente testículos pequeños indica que su producción de semen será deficiente, por lo que se han establecido medidas para la CE en el ganado *Bos taurus* y *Bos indicus*, según se detalla en el cuadro 6 para determinar la calidad potencial de los sementales (Foote, 1983; Coulter et al, 1987; Brito et al, 2002; Brito, 2015b)

Cuadro 6: Circunferencia escrotal expresada en cm recomendada para el *Bos taurus* y *Bos indicus* y cruzas (Adaptado de Foote; Coulter et al; Brito et al; Brito).

Bos taurus	Edad en meses:	12-14	15-20	21-30	+30
	Excelente:	35	37	39	40
	Buena:	31-34	32-36	33-38	34-39
Bos indicus	Edad en meses:	12-14	15-20	21-30	+30
	Excelente:	26	31	35	39
	Buena:	18-25	26-30	31-34	34

Rutter y Russo, 2006, recomiendan a los 24 meses de edad, un toro *Bos taurus* prescindiendo de la raza, debe tener una CE al menos de 33,0 a 35,0 cm y para el *Bos indicus* un mínimo de 32,0 cm.

.Color/Aspecto: El semen bovino presenta una coloración *sui generis*, estando influenciada por la concentración espermática que el eyaculado presente:

-Blanco acuoso. Indica una baja concentración espermática.

-Blanco lechoso. Mediana concentración espermática.

-Blanco cremoso. Alta concentración espermática.

El color nos brinda un dato importante en la evaluación del semen. Aproximadamente, un 5% de los toros presentan una coloración amarillenta, que es normal. Se debe a la presencia de pigmentos como lipocromos y caroteno, provenientes de las células de revestimiento de las ampollas de Henle. En algunos casos puede estar influenciado por la alimentación o por la presencia de cuerpos extraños.

El aspecto está dado por la impresión general que produce el semen en el tubo colector. Brinda una idea, aproximada, de la concentración espermática del mismo, como así también, si hay presencia de cuerpos extraños.

.Ausencia o presencia de elementos extraños: Cuando evaluamos el eyaculado, el primer elemento extraño que debemos considerar es la sangre, ya que los eosinófilos presentes contienen enzimas, como la beta-amilasa, que actúan sobre los factores de decapitación, que la gameta recibe a su paso por el canal epididimal, durante el proceso de maduración espermática, produciéndose una capacitación precoz y la consiguiente falsa reacción acrosomal. Es decir que ese proceso de capacitación espermática, que normalmente debe ocurrir en el tracto genital femenino, se produce “in vitro”, dentro del tubo colector. Esta capacitación precoz como la posterior falsa reacción acrosomal, llevan a la pérdida del poder fecundante del espermatozoide. Es así, que gametas morfológicamente anormales pueden tener movimientos normales, aunque son incapaces de fertilizar al óvulo. La presencia de otros cuerpos extraños, como arena, polvo, tierra, detritus, etc., indican que el eyaculado debe ser descartado.

Evaluación microscópica:

.Subjetiva o convencional: La valoración de la calidad seminal para determinar la fertilidad potencial de un eyaculado o del reproductor del que se colectó, es un indicador importante para el éxito del programa de I.A. a instaurar, como así también, de la eficacia del Centro de Inseminación. La evaluación convencional de una muestra de semen puede determinar su grado de normalidad antes de que el eyaculado sea procesado para la I.A. Normalmente dicha valoración incluye la determinación de diversos parámetros como: capacidad del toro para producir espermatozoides aptos; volumen; aspecto; concentración espermática; motilidad/vigor; morfología espermática, porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y presencia de células extrañas. Los resultados obtenidos dependerán de la capacidad y experiencia del técnico que la realiza.

Para efectuar esta tarea correctamente, es importante contar con los siguientes elementos:

.Microscopio con una óptica adecuada que posea objetivos de:

-Campo claro.

-Contraste de fases: Permite hacer claramente visibles las estructuras de objetos no teñidos en preparaciones vivas.

-Contraste diferencial de Interferencia (CDI) o Sistema Nomarski: Esta óptica hace visible, en forma de relieve, las diferencias de altura y de índice de refracción que acusa el preparado.

-Platina termorregulable: Su utilización es indispensable para desarrollar un trabajo correcto, dado que la temperatura incide en forma notoria sobre la actividad del espermatozoide, la que, con el fin de unificar criterios en lo referente a la evaluación de semen, deberá ser regulada a 37-38°C.

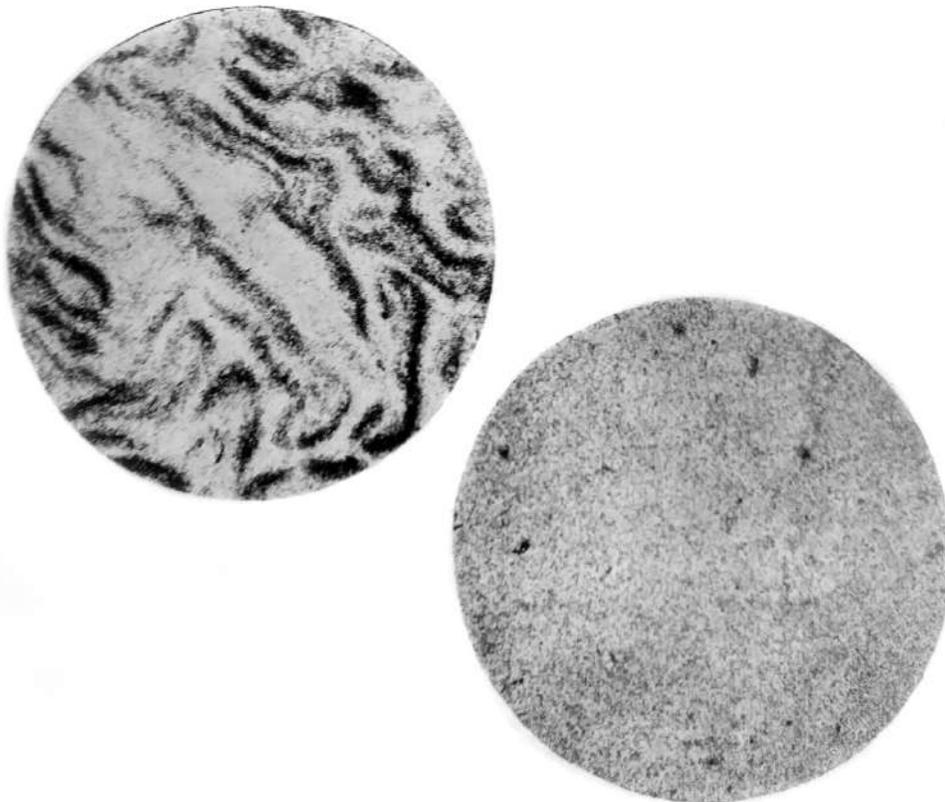
-Bañomaría: Regulado a 37°C para mantener las muestras de semen que se deban incubar por un período de tiempo determinado.

.Motilidad en masa: La motilidad es también una manifestación de integridad estructural y de competencia funcional del espermatozoide. Es sólo uno de los numerosos requisitos que debe reunir el espermatozoide para ser capaz de fecundar un ovocito, sin embargo, ha sido y es todavía, el parámetro más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis de semen criopreservado. La motilidad en masa es un dato orientador, de menor importancia, sobre la calidad de un eyaculado. Se valora partiendo de material seminal sin diluir, en la periferia de una gota gruesa, haciendo la observación con óptica microscópica de campo claro, con 100 aumentos (100x). En una escala subjetiva se pueden utilizar los siguientes rangos:

- Remolinos intensamente apreciables, movimiento en masa: corresponden al semen de máxima calidad.
- Actividad cinética buena: material utilizable en I.A.
- Esperma de movimientos lentos: gran cantidad de espermatozoides muertos. Material descartable.
- Eyaculado necrospérmico: sin actividad espermática.
- Azospermia: ausencia de espermatozoides, sólo presencia de líquido seminal

En la figura 12 se aprecian, dos campos microscópicos de material seminal con distinto grado de motilidad, en el cuadrante superior e izquierdo una muestra con buen movimiento de onda y, en el inferior derecho la muestra de semen con motilidad muy pobre.

Figura 12: Motilidad en onda y pobre motilidad seminal (Millar y Ras, 1962)



.Motilidad individual: La observación del semen diluido en una solución de citrato de sodio al 2.92%, solución fisiológica u otro medio isotónico, nos permitirá evaluar el vigor grado de motilidad progresiva y, estimar el porcentaje con motilidad progresiva rectilínea (MPR) de cada uno de los espermatozoides individualmente, como así también estimar la relación entre espermatozoides vivos y muertos.

Para medir el vigor se utiliza una escala subjetiva de 0 a 5, en donde los grados 0, 1 y 2 son descartables y los grados 3, 4 y 5 son valores crecientes de motilidad progresiva. La evaluación de esta motilidad individual la realizamos por microscopía de contraste de fases, utilizando aumentos de 200x y 500x. A este vigor individual, Roldán, 1975, los califica de la siguiente manera:

- Rectilíneo ascendente (progresivo).
- Ondulante.
- Pendular agónico.
- Muerto.

Es importante tener en cuenta que, normalmente, el espermatozoide pierde su capacidad fecundante antes de perder la motilidad. Es así que, gametas morfológicamente anormales pueden tener movimientos normales, aunque son incapaces de fertilizar al óvulo.

.Relación entre espermatozoides vivos/muertos: Puede ser estimada por un profesional con experiencia en la valoración de semen y es lo que normalmente se hace en un Centro de I.A., pero, de surgir dudas pueden utilizarse tinciones diferenciales para distinguir los espermatozoides vivos de los muertos, como la coloración vital de Brochart-Bloom, eosina-nigrosina, o con eosina amarilla al 0.5%. Sólo se deben procesar eyaculados que presenten un mínimo de 60% de espermatozoides vivos con un grado 3 de vigor.

.Evaluación objetiva: Todos los inconvenientes mencionados para la valoración del semen motivaron numerosos esfuerzos por parte de investigadores, para intentar eliminar la subjetividad inherente al examen microscópico de la motilidad. La implementación de sistemas computarizados, disminuye, en gran medida, el factor subjetivo del análisis convencional, lo que garantiza una mayor correlación con la capacidad fecundante de un eyaculado. Como consecuencia de ello, en la actualidad se disponen de nuevas técnicas analíticas basadas en programas informáticos, que se describen a continuación:

-Computer Assisted Sperm Analysis (C.A.S.A.): permite una valoración objetiva del semen e identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con diferentes patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen, dando una visión más real que la motilidad media de la muestra, dado que una muestra de semen es una población heterogénea de espermatozoides. Por consiguiente, se describen las diferencias encontradas entre el sistema convencional y el sistema C.A.S.A., en cuanto a la valoración seminal de los eyaculados y su posterior procesamiento durante la producción comercial de dosis seminales de toro.

La evaluación mediante el sistema C.A.S.A., se realiza con un equipo SpermVision, Minitüb-Alemania, donde el programa analiza 10 campos microscópicos diferentes y determina los siguientes parámetros:

- Motilidad espermática total.
- Motilidad progresiva. (*)
- Motilidad local. (Movimiento en círculo)
- Concentración espermática.
- Morfología espermática, mediante un programa anexo.

(*) Detalle de los parámetros de motilidad, de uso más frecuente, que mide el C.A.S.A.:

-Distancia: tres alternativas de medición en micrones

- **DAP** = en camino promedio.
- **DCL** = en camino realmente recorrido.
- **DSL** = en línea recta, imaginaria entre punto inicial y final.

-Velocidad: tres maneras diferentes de medirla en micrones/seg.

- **VAP** = del espermatozoide a lo largo de un camino promedio.
- **VCL** = del espermatozoide a lo largo del camino realmente recorrido.
- **VSL** = del espermatozoide a lo largo de una recta imaginaria entre el punto inicial y final del recorrido.

-Desvío de su trayectoria: Movimiento de cabeceo del espermatozoide en micrones.

- **BCF** = frecuencia de corte de la línea de trayectoria, frecuencia con que pega la cabeza.
- **ALH** = movimiento de amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática.

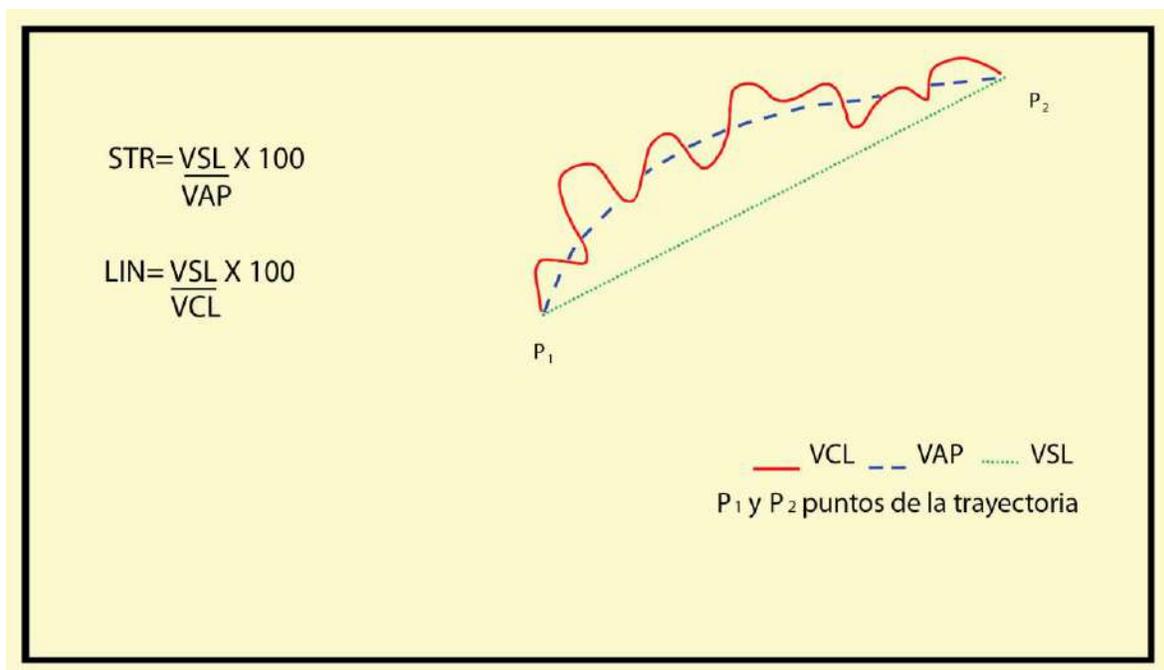
-Dirección de la trayectoria espermática: se mide a través de dos cocientes:

- **LIN** (Linealidad) = $VSL / VCL \times 100$: desvío de la velocidad del camino real a la velocidad en línea recta, expresada en porcentaje.
- **STR** (Rectilineidad) = $VSL / VAP \times 100$: desviación de la velocidad promedio a la velocidad en línea recta, expresada en porcentaje.

Las (**LIN** y **STR**) relacionan la velocidad promedio (**VAP**) o la velocidad real (**VCL**) con la velocidad recorrida en dos puntos (**VSL**), según se aprecia en la figura 13. Ambas nos permiten conocer cómo es la dirección del movimiento y ha sido correlacionada como un factor que incrementa la tasa de fertilidad (Brogliatti et al, 2005)

Según la categorización realizada por Mortimer, 2000, los parámetros **VCL**, **ALH** y **BCF** se consideran medidas que reflejan el vigor de los espermatozoides, y los parámetros **VSL**, **STR** y **LIN** la progresividad de los mismos.

Figura 13: Razones entre las velocidades de los espermatozoides. (Adaptado de HTM-IVOS Software Guide, 2002)



Concluyendo, podríamos expresar que, al contar con un método objetivo para la evaluación, tanto de los eyaculados como del semen criopreservado, sobre diferentes parámetros inherentes a la calidad seminal como: motilidad total, motilidad progresiva y local e incluso morfología espermática, se detecta una diferencia significativa entre la valoración subjetiva convencional y la valoración obtenida a través del sistema C.A.S.A..

En un trabajo realizado en CIAVT, en el año 2005, hemos observado un incremento tanto del porcentaje de Eyaculados Aprobados / Eyaculados Totales, como el de Congelados Aprobados / Eyaculados Totales, y que no se observaran diferencias entre los porcentajes de Congelados Aprobados / Eyaculados Aprobados, significa que se han procesado y congelado 11.3% más de eyaculados. Este efecto se debe al hecho de que el sistema C.A.S.A., califica como aptos eyaculados para la producción que, en el caso de ser analizados por un técnico con evaluación subjetiva y, ante la duda sobre su calidad, hubiesen sido rechazados. Mediante la valoración subjetiva del semen, se tiende a subestimar el porcentaje de motilidad en un 10% debido, probablemente, a que los espermatozoides con menor velocidad, que el C.A.S.A. clasifica como lentos, visualmente fueron considerados sin motilidad.

Por otra parte, la determinación de un 13% más de espermatozoides mediante el sistema C.A.S.A. frente al espectrofotómetro, es un efecto típico, comparado con un fotómetro, el SpermVision otorga valores de recuento espermático ligeramente superiores, debido a que la mayoría de los fotómetros son calibrados por debajo del rango posible, con el fin de que las mediciones realizadas nos otorguen cierto “margen de seguridad” (Miles y Allende, 1981; Cibelli, 1990; Andreozzi, 1990).

Mientras que el método fotométrico está basado en el porcentaje de luz, originada en una fuente lumínica que atraviesa un tubo transparente conteniendo semen diluido con diferentes diluciones, de acuerdo al modelo de fotómetro utilizando el porcentaje de transmitancia, donde a medida que aumenta el número de espermatozoides por unidad de volumen, disminuye el porcentaje de luz transmitida, ya que la misma es desviada o absorbida por las partículas de la solución a investigar. El C.A.S.A. realiza un recuento directo en cámara, haciéndolo sobre 10 campos microscópicos diferentes, que le estaría dando una mayor exactitud al mismo.

En base a lo expresado anteriormente, se considera con herramientas de calificación más precisas, como las que brinda un sistema C.A.S.A. se asegura:

- El correcto cálculo de dilución de cada eyaculado.
- El adecuado respeto a los valores umbrales.
- Con el examen poscongelado se respalda la calidad del material seminal conservado.
- Permite monitorear, en forma rápida, el comportamiento de los toros del Centro de I.A. a través del tiempo.

Para representar en cifras las diferencias encontradas en nuestro trabajo, podríamos expresar que con el mayor número de espermatozoides contados con el sistema C.A.S.A. con respecto al método fotométrico, 1.571 millones de espermios agregando el primero más el segundo eyaculados y, procesado el semen con una concentración espermática total de 20 millones/dosis, se estarían obteniendo 78.55 dosis más por toro y por día de producción, que significaría un incremento de 13% de dosis. Si esto lo relacionamos con la producción de semen de toros con una destacada demanda, la diferencia, tanto desde el aspecto cuantitativo como comercial, es importante.

Con referencia a este tema, recientemente Minitüb / Alemania ha desarrollado el Sistema Integrado para el análisis de semen AndroVision, el que ha sido incorporado por CIAVT en abril de 2016. Es una actualización del SpermVision que combina, el clásico análisis C.A.S.A., con avanzadas opciones para evaluar la funcionalidad de la célula espermática, aportando una mayor precisión en los resultados. La objetividad de evaluación de AndroVision garantiza la aplicación de estándares idénticos en cualquier circunstancia. Hace posible la comparación de datos entre técnicos, laboratorios y días de producción. Permite la identificación, sin dudas, de eyaculados de mala calidad y evita el procesamiento y/o criopreservado de un producto que no cumple los estándares de calidad exigidos por el Centro de I.A. Parámetros como concentración, motilidad, integridad del acrosoma y viabilidad de cientos de espermatozoides pueden ser valorados en forma rápida y, sobre todo, segura, lo que hace a AndroVisión una herramienta más moderna para la evaluación objetiva y completa del semen. Todas las imágenes, toma 90 microfotografías/segundo y la información obtenida se almacena para su posterior revisión. Es la opción ideal para la valoración del semen, en el laboratorio de producción e investigación, dado que proporciona una serie de beneficios como:

- Precisión en la detección de espermatozoides.
- Evaluación exacta de la motilidad.
- Análisis rápido.
- Análisis de morfología y morfometrías.

-Informes

El sistema Andro Vision, integrado para el análisis de semen, se compone de diferentes módulos:

-Morfología y morfometría: Sistema interactivo y de aprendizaje para el análisis de la morfología y la morfometría de los espermatozoides. Determina la longitud y ancho de la cabeza espermática, forma de la cabeza y el ángulo de inserción de la cola. Los resultados se clasifican en una gran variedad de anomalías morfológicas.

-Integridad de la membrana: Recuento automático del porcentaje de espermatozoides con membrana intacta, basado en una doble tinción de fluorescencia.

-Integridad del acrosoma: Recuento automático del porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado, basado en una triple tinción de fluorescencia.

-Citometría de flujo: Vincent et al, 2015, informan con esta tecnología, se analizan las células espermáticas suspendidas en una corriente de líquido, pasando a alta velocidad en frente de uno o varios laser. La luz emitida por los fluorocromos unidos a los zoides, es capturada por tubos fotomultiplicadores que, la convierten en una señal electrónica posteriormente digitalizada por citometría. Los fundamentos de esta herramienta tecnológica se basan en su potencial multiparamétrico y, por el análisis en segundos de miles de espermatozoides. Los citómetros más modernos están equipados, con tres laser y al menos diez tubos fotomultiplicadores, lo que permite etiquetar las células al mismo tiempo, permitiendo así el análisis simultáneo de varios parámetros. Un amplio rango de fluorocromos, se han desarrollado, para evaluar numerosas características de las células espermáticas entre las cuales Vicent et al mencionan:

-Viabilidad/mortalidad: El yoduro de propidio es el fluorocromo más usado para identificar células muertas. La membrana permeable del espermatozoide dañado, le permiten al fluorocromo penetrar y unirse al ADN, donde es activado con un laser 488-nm presente en la mayoría de los citómetros. Un nuevo tinte separable, denominado comercialmente Live/Dead©, está disponible para evaluar la viabilidad celular. Reacciona, con las aminos presentes en la superficie de las células espermáticas intactas, produciendo una tinción muy tenue. Por el contrario, en los espermatozoides muertos, traspasa la membrana dañada, dando lugar a una tinción brillante.

-Integridad del acrosoma: Para su evaluación se utilizan lecitinas vegetales extraídas de la plantas de arveja, *Pisium sativum*, o del maní *Arachia hypogaea*. Estas aglutininas no pueden penetrar a la membrana intacta del acrosoma, sólo lo pueden realizar con los que han tenido la reacción acrosomal o con uno dañado. Sin embargo, es necesario tener presente que las aglutininas de *Pisium sativum* tienen afinidad por la superficie de sitios de unión no específicos sobre las células espermáticas. También, por la yema de huevo, aspecto que puede ser un problema por una falsa interpretación, cuando se analiza semen con diluyente que utilizan este elemento. Las aglutininas de *Arachia hypogaea*, son las más fiables para identificar espermatozoides con acrosomas dañados, dado que se muestran

menos específicas para unirse a otras áreas del espermatozoide. Ambas aglutininas, son etiquetables con fluorocromos FITC, lo que permite su uso en todos los citómetros.

-Actividad mitocondrial: Las mitocondrias son organelas muy importantes involucradas primariamente en la generación de sustratos energéticos para la motilidad de las células espermáticas. La prueba más conocida, para evaluar la actividad mitocondrial, es con el JC-1 un compuesto de ioduro de tetraetil bencimidazol carbocianina. Los espermatozoides que poseen mitocondrias con un alto potencial de membrana, el JC-1 entra en la matrix mitocondrial, donde se acumula en la forma de J-agregados los cuales se transforman en rojos fluorescentes. Por el contrario, las mitocondrias con bajo potencial de membrana, el JC-1 no puede acumularse dentro de las mitocondrias, por lo tanto, permanece en el citoplasma en un monómero fluorescente de color verde. El JC-1 tiene la ventaja, con respecto a otros fluorocromos, de cuantificar la actividad mitocondrial.

-Integridad del ADN: La evaluación del estado de la cromatina, es muy importante en la determinación de la fertilidad potencial del espermatozoide. Vicent et al, informan que la técnica más empleada para evaluar la integridad de la cromatina espermática por citometría de flujo, fue desarrollada por Evenson y Jost del Dpto de Química y Bioquímica de la Universidad de Dakota del Sur. El análisis de la estructura de la cromatina espermática, utiliza la doble emisión fluorescente del naranja de acridina, dependiendo si se une a una o dos cadenas de ADN la fluorescencia será roja o verde, respectivamente. A continuación de un proceso de desnaturalización, la muestra espermática es incubada con naranja de acridina, para luego ser analizada por citometría de flujo. La desnaturalización inducirá la formación de cadenas únicas de ADN, cuando hay ruptura de éste, formando una heterogénea población de fluorescencia roja y verde dependiendo de la integridad de la cromatina. El resultado más importante que deriva de este análisis es la relación de la fluorescencia roja/verde + roja denominada: Índice de fragmentación del ADN, donde un alto valor se correlaciona con un elevado daño del ADN, el cual está correlacionado negativamente con la fertilidad.

Otro test, para evaluar la integridad de la cromatina por citometría de flujo, es la denominada Tunnel por sus siglas en inglés. Puede identificar las cadenas rotas de ADN, dado que la enzima transferasa incorpora el fluorescente al nucleótido modificado en el lugar de ruptura de la cromatina.

-Flujo de calcio: Es uno de los primeros pasos involucrados en el proceso de capacitación espermática. El aumento del calcio intracelular, finalmente conduce a la fosforilización de la tirosina y, en última instancia, a los residuos de serina en las proteínas regulando una cascada de señales. La prueba más usada, para determinar la concentración del calcio intracelular en las células espermáticas, es la Fluo-3/4. La Fluo-3-libre de calcio, es una molécula no fluorescente, pero cuando los iones calcio entran a las células, se unen a ella y se convierte en fluorescente.

Vincent et al, concluyen que el análisis multiparamétrico realizado por los Centros de I.A. a través del C.A.S.A. y la citometría de flujo, demuestra un potencial de predicción muy alto de la calidad del semen y la fertilidad. Consideran, dado que esta última tiene aspectos multiparamétricos, la investigación y el desarrollo de nuevos marcadores necesitan ser muy intensas, para poder identificar con precisión al material seminal con un alto potencial de

fecundación. También, sostienen que la incorporación de estas herramientas a los Centros de I.A., ayudará a la estandarización de los procedimientos de control de calidad eliminando los aspectos subjetivos en la evaluación del semen.

.Morfología espermática: La evaluación de la morfología espermática de cada toro, constituye un importante control de calidad en la producción de semen congelado. Es un parámetro objetivo y tiene una relación directa con la fertilidad: a mayor normalidad morfológica, mayor fertilidad (Sara y Durand, 2009). Además, como el control de la morfología espermática tiene validez reconocida por su relación con la fertilidad posterior, al ser realizada sobre el semen fresco, se aconseja que la interpretación de los resultados obtenidos, cuando es efectuada sobre el semen congelado, sea analizada con cierta cautela dado que en el semen congelado/descongelado pueden presentarse un porcentaje considerablemente mayor de alteraciones morfológicas, que en el semen fresco no procesado. Luego del proceso de criopreservación y descongelado del semen bovino, se produce un incremento significativo de alteraciones en la morfología espermática, básicamente en pieza media distal refleja (doblada), cola enrollada y cabeza libre (sin cola).

El objetivo de evaluar la morfología espermática es el de poder llegar a determinar el número y tipo de anomalías, cuáles de ellas constituyen una causa verdadera de infertilidad y qué nivel de anomalías morfológicas es aceptable en un material seminal.

El concepto de anomalías o defectos primarios o secundarios ha sido muy utilizado, donde un defecto primario es el que se origina durante el proceso de la espermatogénesis, dentro del testículo, y un defecto espermático secundario tiene su origen a través del tránsito epididimal o dentro del ambiente del laboratorio, incluyendo los errores cometidos en la preparación de frotis de semen. Es decir, los defectos secundarios, corresponden a alteraciones posteriores a la génesis del espermatozoide.

Por definición, el defecto espermático primario o secundario destaca el origen y no el tipo de lesión.

En la figura 14 se grafican el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas primarias y el porcentaje total de anomalías espermáticas, observadas en toros Holstein a una edad $\geq 4,5$ años, para las recolecciones de semen realizadas entre los años 1958 y 2002, en ABS Global, DeForest, Wisconsin.

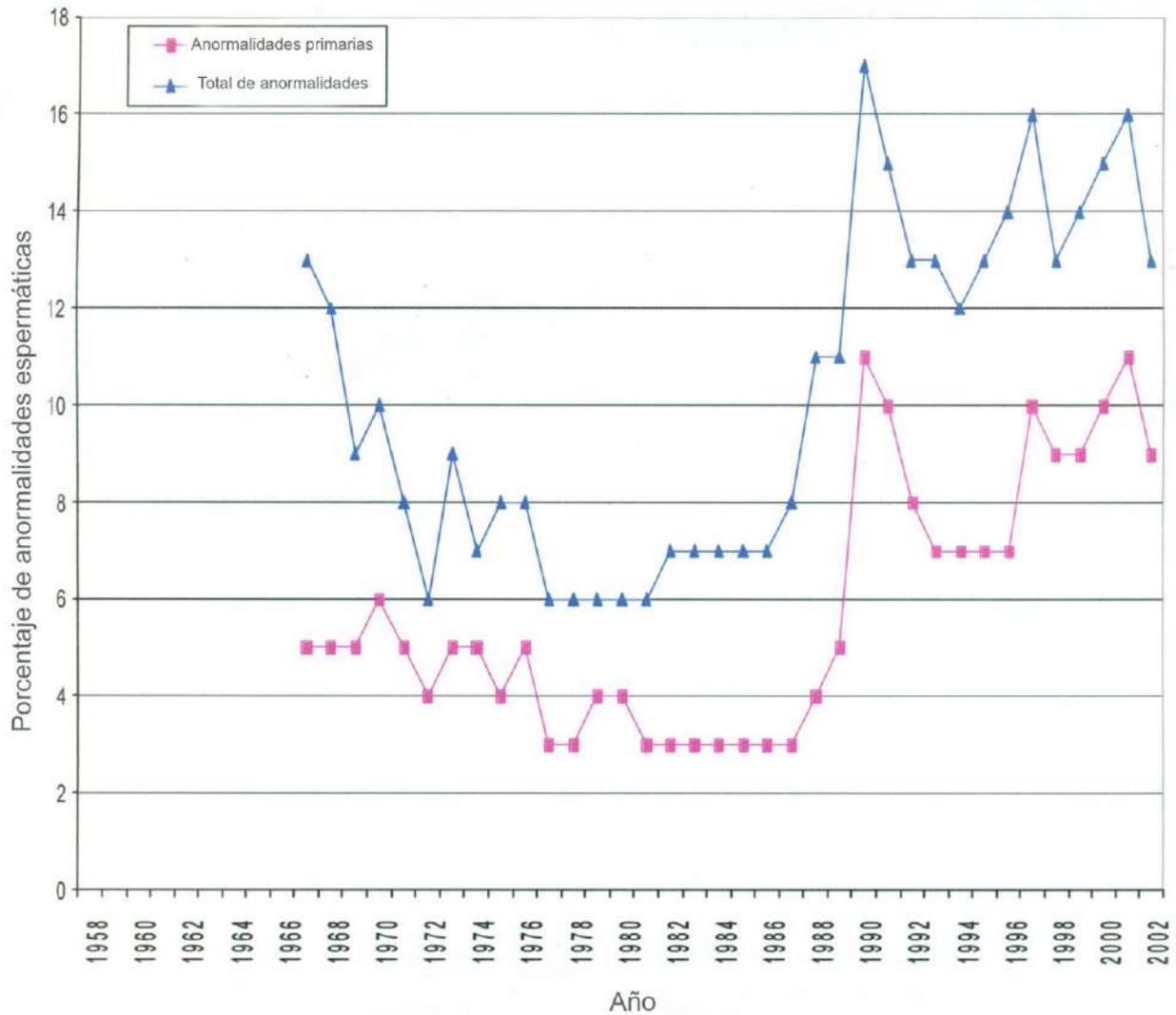
De acuerdo con Mitchell et al, 1985, otro sistema de clasificación fue utilizado por los Centros de I.A. en Estados Unidos, basado en la ubicación anatómica del defecto espermático:

-Primarios: los defectos a nivel de cabeza.

-Secundarios: gotas citoplasmáticas.

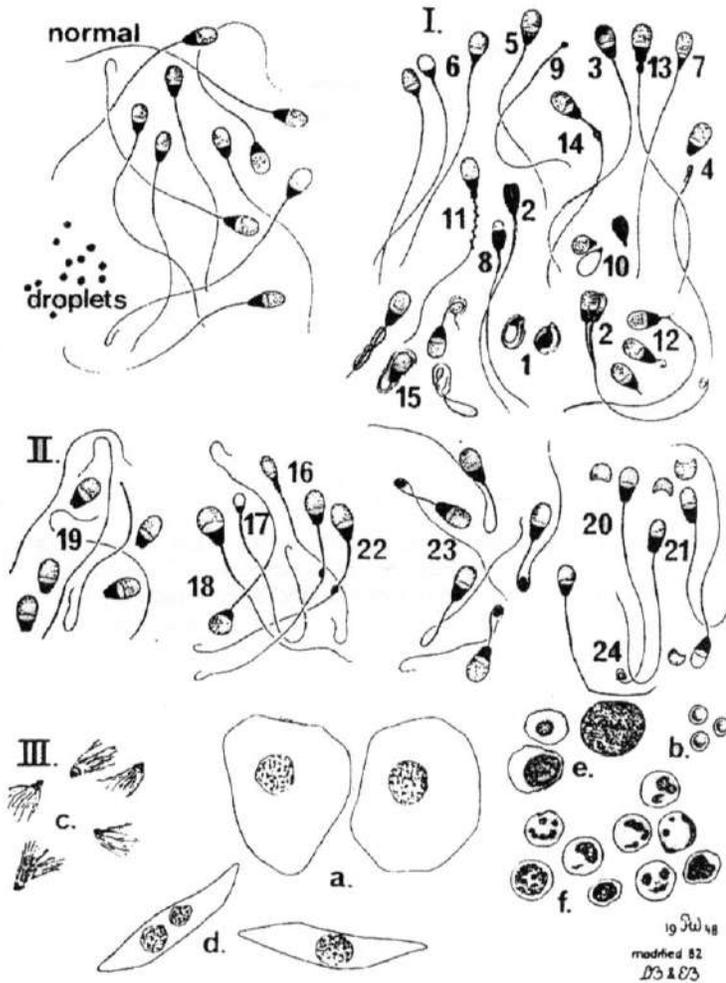
-Terciarios: defectos a nivel de la cola.

Figura 14: Anormalidades morfológicas primarias y el porcentaje total de anormalidades espermáticas, observadas en toros Holstein a una edad $\geq 4,5$ años. (ABS Global, DeForest, Wisconsin, datos no publicados)



Blom, 1983, reconoció la confusión provocada por las diferentes definiciones de alteraciones en la morfología espermática e incorporó un nuevo sistema de clasificación de los defectos en mayores y menores que se muestran en la figura 15. Un defecto mayor es aquel que, presente en gran cantidad, es asociado con infertilidad. Los defectos menores no son asociados con infertilidad o al menos no afectan, en mayor medida, la fertilidad.

Figura 15: Anormalidades espermáticas mayores y menores (Blom, E., 1983)



- I. Defectos mayores:** 1- No desarrollado. 2- Dobles formas. 3- Acrosoma deformado. 4- Sin cabeza. 5- Defecto "diadema" (vacuolas nucleares). 6- Cabeza piriforme. 7- Cabeza con base estrecha. 8- Contorno anormal. 9- Microcefálico anormal. 10- Cabeza suelta. 11- Defecto sacacorchos en pieza intermedia. 12- Otros defectos en pieza intermedia (cola muñón). 13- Gota citoplasmática proximal. 14- Pseudo gota. 15- Defecto "dag".
- II. Defectos menores:** 16- Cabeza estrecha. 17- Microcefálico normal. 18- Macrocefálico, cabeza ancha y corta. 19- Cabeza suelta normal. 20- Membrana acrosómica suelta. 21- Pieza intermedia con implantación abaxial. 22- Gota citoplasmática distal. 23- Pieza media distal refleja-colas sueltas. 24- Punta de cola arrollada.
- III. Otras células anormales:** a- Células epiteliales. b- Eritrocitos. c- Medusas. d- Células en bote. e- Células redondas. f- Píocitos.

Quizá, como expresa Barth, 1991, sería más apropiado terminar con la clasificación de los defectos espermáticos y considerar, en su lugar, su significado, teniendo en cuenta que algunos defectos espermáticos son más importantes para la fertilidad que otros.

Según Saacke, 1986, existen parámetros seminales que son compensables y otros no compensables, de acuerdo a las siguientes consideraciones:

-Defectos compensables: comprenden a los espermatozoides anormales que tienen la incapacidad de llegar al oviducto, pero si son transportados, penetran la zona pelúcida e inician el bloqueo de la poliespermia. Éstos pueden ser compensados con un incremento de la concentración espermática de la dosis de semen.

-Defectos no compensables: Es el caso en el que espermatozoides anormales son capaces de penetrar la zona pelúcida causando la reacción de zona, pero es incapaz de continuar el proceso de fertilización o de sostener el desarrollo embrionario temprano y no pueden ser compensados con un aumento de la concentración espermática de la dosis.

Cuanto más parámetros se consideren en un protocolo de control de calidad espermática, mayor será la posibilidad de revelar defectos compensables y no compensables. Si bien el diagnóstico de rasgos seminales compensables y no compensables es igualmente importante, el foco debería ser puesto en los rasgos no compensables, ya que resultan en una disminución en la fertilidad independientemente de la dosis utilizada. (Dalton et al, 2011)

Independientemente de la clasificación utilizada, para ser compatibles con un adecuado nivel de fertilidad, debemos admitir, como valor mínimo, que un 70% de los espermatozoides deben ser morfológicamente normales.

El Contraste Diferencial de Interferencia (DIC) o Sistema Nomarski, es el sistema óptico de microscopía de elección para realizar la valoración de la morfología espermática, ya que es considerado superior al sistema de contraste de fases para la observación de defectos espermáticos.

.Concentración espermática: Es un parámetro muy variable que depende de varios factores similares a los descriptos al desarrollar la sección: Valoración del eyaculado–Examen macroscópico–Volumen.

La importancia de la concentración espermática radica en que de ésta depende el número total de espermatozoides del eyaculado y el valor de éste nos indicará la dilución a efectuar a dicho material seminal, de acuerdo al número de espermatozoides que consideremos adecuado incorporar a cada dosis de semen o unidad de inseminación.

Según lo recomendado por Decuadro-Hansen, la concentración espermática por dosis de semen criopreservado debe tener una relación directa con la calidad del semen obtenido en el eyaculado, edad del reproductor y al ritmo de colecta al que éste es sometido.

Como guía general y para tenerlo como punto de referencia, indica que en Francia se utilizan las siguientes concentraciones espermáticas, por dosis de semen en pajuelas:

-En toros de alto nivel genético y alta demanda: 12-15 millones de zoides/dosis.

-Toros standard de comportamiento normal: 18-20 millones de zoides/dosis.

-Toros en prueba sin información de fertilidad: 20-23 millones de zoides/dosis.

Cinco son los métodos utilizados para determinar la concentración espermática:

1. Estimación visual a través del microscopio: Cálculo subjetivo que depende, fundamentalmente, de la experiencia del operador y pasible a frecuentes errores de variada consideración.
2. Recuento espermático por hemocitometría: Este método es adecuado en cuanto a su exactitud, ya que se estima un error de $\pm 10\%$, dependiendo de la experiencia del técnico que la realice, pero la crítica que puede hacersele, especialmente si son varias las lecturas que deben efectuarse por día, es su desarrollo lento y tedioso.
3. Contaje por el método fotométrico: Basado en el porcentaje de luz, originada en la fuente que tiene incorporada el equipo, que atraviesa un tubo transparente conteniendo semen diluido. Esta dilución dependerá de las especificaciones dadas por el fabricante del fotómetro a utilizar. A medida que aumenta el número de zoides por unidad de volumen, disminuye el porcentaje de luz transmitida, ya que la misma es desviada o absorbida por las partículas de la solución a investigar. Este porcentaje de transmitancia se verá reflejado en la escala que posee el espectrofotómetro, valor éste que debe ser transformado, en base a recuentos previos de zoides realizados mediante cámara cuentaglobulos, a número de zoides por ml de semen. El equipo deberá ser controlado y calibrado periódicamente, mediante valores logrados por recuento en hemocitómetro o por medio de tubos conteniendo soluciones testigo que representan diferentes niveles de concentración espermática conocidas (Miles y Allende).
4. C.A.S.A. (Computer Assisted Sperm Analysis): Este sistema de análisis automático computarizado de espermios, otorga valores de recuento espermático ligeramente superiores a los obtenidos por medio del espectrofotómetro. Realiza un recuento directo en cámara, sobre 10 campos microscópicos diferentes, que le estaría dando una mayor exactitud al mismo. Por otra parte, sabemos que la mayoría de los fotómetros son calibrados por debajo del rango posible, con el fin de que las mediciones realizadas otorguen cierto "margen de seguridad".
5. Citometría de flujo: Tiene una alta precisión, con un coeficiente de variación de 3,5 y 2,4 % para el semen fresco y el congelado, respectivamente. Por lo tanto, el uso de esta técnica, permite producir distintas partidas de material seminal con una concentración espermática muy uniforme por dosis (Christensen et al, 2005).

.Densidad del semen: Es, aproximadamente, de 1.036, siendo este valor directamente proporcional a la concentración espermática. La densidad de los espermatozoides se encuentra entre valores de 1.240 / 1.330 y la del líquido seminal es de 1.005, lo que explica la correlación positiva entre densidad y concentración espermática.

.pH del semen: Al igual que la densidad, no es un parámetro que se controle rutinariamente en el trabajo del laboratorio. Al examen del eyaculado, el semen normal muestra un pH levemente ácido. Los valores están entre 6.5–6.9, con una media de 6.75.

Es importante conocer estos valores en la confección de las diferentes fórmulas de diluyentes existentes y que son utilizados, en el trabajo de procesado del semen, en la dilución del mismo y previo a su preparación para su posterior proceso de criopreservación.

Una vez determinado el pH del medio dilutorio, éste se podrá regular a los valores 6.7-6.8, requeridos, titulándolo con soluciones de bicarbonato de sodio, cuando el pH del medio es levemente ácido, o de ácido cítrico, si el medio muestra un pH alcalino. Cada uno de estos pasos deberán ser controlados por medio de un pH-metro electrónico, previamente regulado a través de soluciones de pH conocido, existentes en el mercado.

.Pruebas complementarias:

-Test de Schalm: Aplicable al diagnóstico de piopermia y es de valor para identificar la semiovesiculitis subclínica en el toro. Se recomienda realizar este test, como rutina cada 30 días o si se observan los problemas siguientes:

-Calidad seminal.

-Baja concentración espermática.

-Vigor o grado de motilidad por debajo de los valores normales

-Más del 30% de zoides morfológicamente anormales.

Detalle de la técnica:

1. Colocar en una paleta de CMT (California Mastitis Test) 0.5 ml de semen crudo + 2.5 ml de reactivo CMT.
2. Mezclar por rotación de la paleta CMT durante 30”
3. Realizar la lectura e interpretación

Resultado:

0 (negativo) líquido violeta o amarillo según el pH.

+ grumos que desaparecen en 1 minuto.

++ gel como clara de huevo.

+++ gel como pegamento (queda adherido a la paleta)

La sensibilidad de esta prueba es de 50.000 leucocitos/ml.

Si el resultado es Schalm+, se deberá realizar un examen clínico y de laboratorio. Ante la sospecha de seminovesculitis subclínica, Decuadro-Hansen recomienda obtener líquido de las vesículas seminales, por medio de una sonda uretral, con el objetivo de realizar un cultivo y antibiograma.

.Dilución y conservación del esperma: El objetivo primario de la I.A., como lo expresáramos anteriormente, es el de permitir el uso masivo de toros genéticamente superiores. Esto se logra maximizando el número de dosis de semen obtenidas de un eyaculado, sin reducción de la fertilidad. La dilución y extensión del semen en un medio apropiado, su procesado y posterior almacenamiento a baja temperatura, en nitrógeno líquido a -196°C , permite la conservación, por tiempo indefinido, de dosis fértiles de semen bovino.

Es en base a esta introducción, que queda perfectamente evidenciada la importancia de los diversos diluyentes utilizados en el procesado del semen. Mucho es lo que se ha investigado sobre este tema y en la actualidad contamos con numerosos medios dilutorios de aplicación práctica y correcto comportamiento, quedando a criterio del responsable la elección de uno de ellos.

No es objetivo de esta presentación hacer un pormenorizado detalle de las diferentes fórmulas de diluyentes que se utilizan en el proceso de conservación del material seminal, pero sí vamos a enumerar, a continuación, los requisitos que debe cumplir un diluyente:

- Favorecer el metabolismo del espermatozoide, incorporando elementos nutritivos.
- Presión osmótica isotónica con respecto al esperma y concentración electrolítica constante.
- El pH debe favorecer la conservación de la vitalidad espermática. Se logra con un pH de 6.8 ± 0.3
- Protector del esperma contra el “*shock a frigore*”.
- Controlar el incremento de la población bacteriana con la adición de antibióticos al medio, en una concentración suficiente para que éstos actúen como bacteriostáticos, evitando la multiplicación de bacterias.
- De fácil preparación.

Resumiendo, podríamos expresar que, en la actualidad, los diluyentes utilizados están basados en los siguientes componentes:

- Agua: solvente del semen e integrante del diluyente.
- Sustancias iónicas y no iónicas: que mantengan la osmoralidad, la cantidad de partículas de soluto suspendidas en la solución y amortiguen el pH del medio.
- Materiales orgánicos: con capacidad para prevenir o atenuar el “*shock a frigore*”.

Este shock de frío es una irreversible injuria del espermatozoide, causada por un rápido descenso de la temperatura del semen durante su criopreservación. Su consecuencia es la

pérdida de la motilidad, de la actividad metabólica, actividad respiratoria y glicólisis, además de la capacidad fecundante, por un violento deterioro de la membrana plasmática.

El mecanismo de protección de los diluyentes contra el “shock a frigore”, es el de estabilizar la membrana celular, reduciendo la permeabilidad. Como agente crioprotector se utilizan el glicerol (Propanotriol) o el DMSO (Dimetil-sulfóxido).

-Hidratos de Carbono: como fuente de energía.

-Antibióticos: se deben incorporar antibióticos al diluyente del semen como bacteriostático con la finalidad de:

.Controlar la flora banal: proteus, micrococos, estreptococos, etc.

.Controlar la flora patógena, eventualmente presente en el semen: campylobacter foetus, haemophilus somnus, mycoplasma bovis, ureaplasma.

Un control microbiológico efectivo es aquel en el cual, el número de organismos potencialmente presentes bajo condiciones patológicas, se reduce a niveles subclínicos, es decir, por debajo del umbral de efectividad.

En el sistema americano, la combinación de antibióticos, es incorporada directamente al semen eyaculado. Los antibióticos utilizados, con una concentración final por cada ml de semen congelado son:

Protocolo GTLS/CSS (NAAB/USA):

- . Sulfato de Gentamicina 250 ug/ml
- . Tilosina 50 ug/ml
- . Lincomicina 150 ug/ml
- . Espectinomicina 300 ug/ml

En el sistema europeo, los antibióticos son incorporados al diluyente de semen

Protocolo 88/407 (CEE):

Además, de la combinación de antibióticos del protocolo GTLS/CSS (NAAB/USA) incorporan:

- Penicilina 500 UI/ml
- Estreptomina 500 ug/ml
- Lincomicina 150 ug/ml
- Espectinomicina 300 ug/ml

.Nuevos diluyentes: Actualmente, se han desarrollado diluyentes de semen bovino de última generación, de muy fácil preparación. Sus principales ventajas son que no contienen sustancias de origen animal, dado que se considera que el componente del diluyente que más contamina el semen es la yema de huevo. Están basados en el uso de lipoproteínas y lipopolisacáridos de origen vegetal, principalmente a partir de extractos de soja. Además, estos diluyentes por su transparencia, facilitan un mejor análisis de los espermatozoides al microscopio.

Referente a este tema, un estudio comparativo entre un diluyente conteniendo Soja/Lecitina (SL) y otro basado en TRIS/Yema de huevo (TRIS-EY), mostró que, al descongelado, la motilidad espermática fue significativamente más baja ($P < 0.05$) cuando el semen fue diluido en TRIS/Yema de huevo (TRIS-EY). Asimismo, las pruebas “a campo” (I.A.) revelaron que las tasas de NR para el diluyente SL fueron significativamente más altas ($P < 0.0001$) comparadas con las tasas de NR del diluyente TRIS-EY 70.45 y 67.85%, respectivamente. Se concluye que un diluyente de semen conteniendo Soja/Lecitina (SL) será una mejor elección para utilizar en el futuro.

En consecuencia, es imprescindible que el diluyente empleado para la criopreservación del semen proteja la motilidad espermática, la función de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma.

-Valoración del semen criopreservado: El éxito de la criopreservación del semen, logrado a partir de las investigaciones de autores británicos Polge, Chris., Smith, Audrey y Parkes, Allan en 1949, se basa en las propiedades crioprotectoras del glicerol, el propanotriol, un trialcohol que incorporado en porcentajes adecuados a los diluyentes para el procesado del semen, permite la recuperación de espermatozoides fértiles, a partir de este producto, luego de haber sido congelado para su conservación.

.Criopreservación y daño espermático: Contrariamente a una difundida creencia acerca que las células espermáticas sufren importantes alteraciones al tener que soportar los -196°C que le proveen el nitrógeno líquido, en realidad los puntos críticos del proceso estarían situados entre los -10 a -50°C , éstos rangos que la célula debe atravesar en dos oportunidades, en el proceso de congelado y el de descongelado. Por esto es factible que eyaculados aptos para ser congelados sufran, durante este proceso, daños irreversibles a nivel de la estructura espermática que los torne no aptos para la I.A.

Los dos factores que actúan e inciden en el daño del espermatozoide durante el proceso de congelado son:

-Efecto de solución

-Formación de hielo intracelular

Hablaremos de efecto de solución cuando, por causas de una baja velocidad de congelado, aumente la concentración de sales y otros componentes del diluyente (solutos) a medida que el agua es congelada y convertida en cristales de hielo. Los efectos producidos por estos componentes sobre el espermatozoide, constituyen el “efecto de solución”, el que puede producir la destrucción de la membrana plasmática, como se esquematiza en la figura 16.

.Formación de hielo intracelular: Una alta velocidad de enfriado impide que el agua pueda ser “quitada” de la célula con la rapidez suficiente, produciéndose una violenta contracción de la membrana plasmática, con formación de hielo intracelular. Esto es considerado un factor primario, responsable de la muerte de la célula durante el proceso de congelado. Por consiguiente y en base a lo anteriormente descrito, se puede concluir que lograremos una curva de enfriamiento óptima cuando la velocidad de enfriado sea lo suficientemente rápida

como para disminuir al máximo el “efecto de solución” y tan lenta como sea necesario para impedir la formación de hielo intracelular según se muestra en la figura 17

Figura 16: Los efectos de la rapidez de enfriado sobre la supervivencia espermática (Saacke, R., 1983)

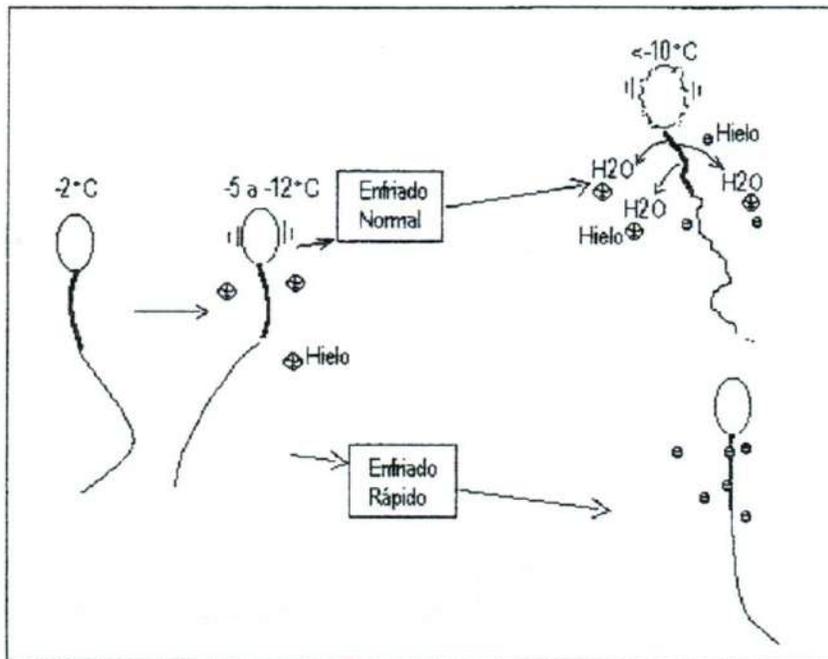
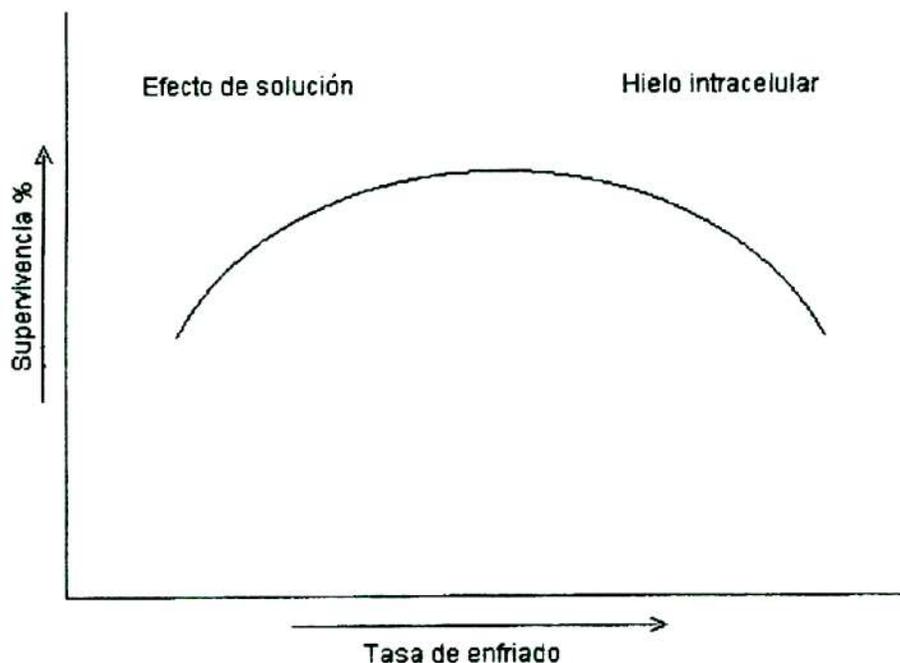


Figura 17: Los efectos de la rapidez de enfriado en la supervivencia espermática luego del proceso de congelado y descongelado (Saacke, R., 1983)



En todo este proceso, el glicerol cumple una función primordial:

-Ordena los cristales de hielo tanto endo como extracelulares y reduce la cantidad de hielo formado, lo que da como resultado una merma en la concentración de solutos a los que están expuestas las células. Es decir que el glicerol disminuye el “efecto de solución” en el congelado de la célula espermática.

-Actúa como tampón electrolítico.

-Penetra dentro de la célula, interviniendo directamente en el metabolismo del espermatozoide.

-Se localiza en la base del núcleo y en la cola y actúa formando CO₂, creando un medio anaeróbico, el que favorece el metabolismo de la fructosa.

-Reduce, alrededor de la célula a cualquier temperatura, la concentración electrolítica de la solución que aun no está congelada.

-Aminorar pero no anula el “efecto de solución”.

Con relación a este tema, se destaca un trabajo realizado por Mazzeo y Monti, 2019, respecto al control del funcionamiento de la termocupla y los tiempos de enfriado. A partir del mismo, se logró determinar, a través del AndroVision (C.A.S.A.), que se llega al punto crítico de cristalización del semen, que correspondería a la formación del hielo intracelular, de acuerdo a lo mencionado precedentemente por Saacke, con una velocidad de turbina de la máquina congeladora de 80, en un tiempo de 40 a 50”.

Paralelamente, también se comprueba a dicha velocidad de turbina, la temperatura ambiente y dentro de la pajuela se igualan a -120°C. En base a estas conclusiones, se realizará la criopreservación del semen a una temperatura en la máquina congeladora de -120°C, durante 10 minutos y con una velocidad de turbina de 80.

Actualmente, se está trabajando sobre una nueva técnica de criopreservación de semen denominada VITRIFICACIÓN, como alternativa para evitar o disminuir al máximo el daño espermático en la formación de hielo intracelular durante el congelado profundo. Básicamente, se trata de un proceso mediante el cual el semen diluido y luego de su correspondiente período de estabilización, en su criopreservación, pasa al estado sólido sin formación de cristales de hielo. Es muy probable que esta técnica permita una mejoría sustancial en la criopreservación del semen, fundamentalmente, en el de la especie porcina que es la más afectada con el sistema convencional de congelado.

.Evaluación del semen: La estimación de la fertilidad mediante un simple análisis “in vitro” es todavía incierto debido a las diferencias entre los resultados del laboratorio y los resultados de fertilidad “in vivo”.

Debido a que no todos los eyaculados seleccionados para ser procesados mantendrán un comportamiento acorde con los estándares de calidad exigibles para un semen postcongelado, referido a la relación vivos/muertos; vigor y porcentaje de anomalías espermáticas, es que la valoración del semen criopreservado o control de calidad cobra una importancia fundamental, ya que de ésta dependerá el destino definitivo del material seminal. Lógicamente que cuantos más parámetros consideremos en un protocolo de control de calidad del semen criopreservado-descongelado, mayores serán nuestras posibilidades de detectar defectos en un material seminal determinado.

Para realizar esta tarea, tal como se describió con anterioridad en la evaluación del semen fresco, se cuenta con métodos subjetivos, utilizados en la rutina del laboratorio y que dependerán mucho de la experiencia del técnico operador y con métodos objetivos, algunos de los cuales son utilizados por laboratorios que hayan incorporado modernos equipos de sistemas visuales integrados analizadores de espermatozoides sistema C.A.S.A. y la citometría de flujo.

Es importante contar con un semen congelado testigo proveniente, en lo posible, de un solo eyaculado y de comportamiento conocido, para ser utilizado como testigo en las pruebas de evaluación que nos dejen dudas. La comparación del semen testigo con la muestra a controlar podrá definir el destino de ese material seminal.

IV. Calidad biológica

En cuanto a la calidad biológica del semen, últimamente han sucedido cambios de importancia. En lo referente, a la relación entre la cantidad de espermatozoides por dosis y la fertilidad, se ha demostrado un “efecto toro” muy importante. La concentración de células espermáticas, por unidad seminal para realizar la I.A., de acuerdo con Decuadro-Hansen es toro dependiente.

Es fundamental y muy importante, en la valoración del semen criopreservado, uniformar el método de descongelado. En nuestra actividad procedemos de la siguiente forma:

-Extraer la pajuela a analizar del recipiente con Nitrógeno líquido, que la contiene.

-Depositarla, en un recipiente térmico o descongelador “*ad hoc*”, en agua a 34°C durante 1 minuto.

.Pruebas de laboratorio. Es de importancia conocer el tipo de diluyente utilizado en el procesado del semen a investigar:

-citrato-yema

-leche entera

-leche descremada

-Tris / hidroximetil aminometano; los más modernos a base de

-lipoproteínas y lipopolisacáridos de origen vegetal, que no contienen sustancias de origen animal, ya que su imagen o aspecto en el preparado microscópico difiere ostensiblemente, fundamentalmente en los diluyentes a base de leche

También, cuando se carece de experiencia en el tema, resulta imprescindible evitar los errores de apreciación.

.Prueba de Observación Directa: En ella se procede al descongelado de tres unidades de semen de un mismo eyaculado, para descartar el “efecto dosis”, colocar su contenido en un tubo de Khan o similar, se toma con pipeta de fino calibre un pequeño volumen de semen descongelado y se hacen dos muestras sobre la superficie del portaobjetos, tratando de hacer siempre muestras del mismo tamaño y se cubre con cubreobjetos, utilizando a éstos, de ser posible, siempre de la misma medida. Utilizando el sistema óptico de contraste de fases (200/500x) se realizan las siguientes evaluaciones:

-Grado de motilidad progresiva o vigor: Se utiliza una escala de valores subjetiva de 0 a 5, en la que los grados 0, 1 y 2 son descartados y los grados 3,4 y 5 son grados aptos y crecientes de motilidad.

-Relación de espermatozoides vivos/muertos: Es recomendable trabajar con muestras de poco volumen, lámina del preparado muy fina, de modo de contar con pocos espermatozoides por campo microscópico. Preferentemente trabajar con 500x, posibilitándose así un cálculo más ajustado. Se consideran, como valores mínimos, un 30% de espermatozoides vivos/móviles, con un grado 3 de vigor.

-Porcentaje de formas anormales: Muchas pruebas han demostrado la correlación positiva entre defectos espermáticos e infertilidad. Generalmente, el límite máximo de defectos de cabeza del espermatozoide se encuentra en el valor de 15/20%, mientras que defectos de acrosoma y de cola se puede tolerar hasta un 25% de los zoides. Como mínimo un 70% de los espermatozoides deben ser morfológicamente normales. Sobre este tema, se recomienda que los resultados obtenidos con el semen criopreservado sean analizados con precaución, pues seguramente, se presentará un mayor porcentaje de alteraciones morfológicas que en el semen fresco sin procesar.

-Porcentaje de acrosomas intactos (PAI): En la valoración de la integridad del acrosoma, se recomienda utilizar el sistema óptico de Contraste Diferencial de Interferencia (DIC) o Sistema Nomarski. El valor porcentual de las alteraciones acrosómicas con respecto a los normales, tienen una estrecha relación con los índices de fertilidad del material seminal. Para llevar a cabo este procedimiento, se debe diluir el semen en un portaobjetos con una solución de suero formolado al 1%, produce la muerte espermatozoide sin alterar su estructura, cubriéndolo luego con un cubreobjetos. Es posible hacer la evaluación del acrosoma inmediatamente después de descongelado el semen, denominada Evaluación Directa, o luego de 2 hs. de incubación a 37°C. Se deben contar, como mínimo, 100 células recomendándose los siguientes valores:

-Evaluación Directa: 60% de acrosomas intactos.

-Incubación a 37°C por 2 hs.: 40% de acrosomas intactos.

-Test de resistencia osmótica: Permite determinar la integridad de membrana. Se vierte el contenido de una dosis de semen en una solución hipoosmótica de fructosa y citrato trisódico. Se utilizan 2 ml y 1 ml de solución hipoosmótica para pajuelas medianas de 0.5 y finas de 0.25 ml, respectivamente.

La solución para el test de resistencia osmótica se compone de:

-Fructosa: 9.0 g
-Citrato Trisódico: 4.9 g
-Agua destilada (csp): 1.000 ml

Se incuban en bañomaría a 37/38°C por 60 minutos. Colocar 2 gotas de 6 ul entre porta y cubreobjetos por cada tubo. Se deben contar 200 células a 400x, debiendo realizar la observación a las 0, 1 y 2 horas.

RESULTADO: Los espermatozoides con colas enrolladas están vivos, son los reaccionantes. Si se observan más cantidad de colas enrolladas, es mejor la calidad del material seminal. Un semen con 40% de reaccionantes es calificado como excelente.

-Test de termorresistencia (TTR) de Dimitropoulos: Es una prueba de incubación a 37°C a la que es sometido el material seminal durante un tiempo determinado (2, 3 ó más hs.), culminando con una valoración microscópica de la motilidad espermática. En principio, la valoración de la motilidad espermática luego de haber sometido al semen a una prueba de stress, podría representar el tiempo de viabilidad del zoide a esa temperatura (37°C) en el tracto genital de la hembra y por consiguiente considerarse adecuada, pero hay que tener en cuenta que las condiciones de la prueba “in vitro”, obviamente difieren de las condiciones “in vivo” que le ofrece el tracto genital, donde el espermatozoide es acompañado de flujos que favorecen, naturalmente su viabilidad del esperma (Saacke, 1983).

Al respecto, Decuadro-Hansen, coincidiendo con lo expresado por Saacke, cita una serie de trabajos sobre la validez del TTR que se mencionan seguidamente:

-Una experiencia brasileña, realizada por los integrantes del Dpto. de Reproducción Animal y Radiología Veterinaria, FMVZ, de la Universidad del Estado de San Pablo-Brasil, no encontró evidencias de una correlación positiva entre las pruebas de termorresistencia y la fertilidad lograda con semen congelado, visto que las dosis que tuvieron tasas de motilidad inferiores a los valores críticos establecidos para las pruebas, dieron tasas de preñez similares a las obtenidas cuando se utilizaron dosis con mayor porcentaje de motilidad. Los autores expresan que sus resultados indicarían que las pruebas de termorresistencia no simulan condiciones uterinas y recuerdan que el tracto genital femenino contiene muchas sustancias que podrían apoyar el mantenimiento de los zoides hasta el momento de la fertilización. Concluyen que sus estudios indican que las pruebas de termorresistencia son demasiado extremistas y no deberían ser utilizadas como únicas para predecir la fertilidad de semen congelado de toro.

-Estos resultados no coinciden con los logrados por Dimitropoulos, quien verificó una correlación positiva y significativa entre la motilidad lograda con la prueba de termorresistencia y fertilidad evaluada por NR 60-90 días. Asimismo, tampoco con Jondet y Rabadeux, que recomendaron la eliminación de todas las dosis con menos de un 20% de zoides mótils después de la prueba. Barth propone un valor mínimo para el TTR de 15% de zoides con motilidad progresiva, con un grado 2 de Vigor con 2 hs. de incubación a 37°C.

Además, Decuadro-Hansen considera que, no existe un lenguaje común con respecto al TTR a nivel mundial, lo que lo hace poco comparable. El problema es la armonización entre los centros de I.A., en Francia menos del 10% de los Centros de I.A practican el TTR en la valoración del semen que producen y, además, no encuentran correlación entre este test y la fertilidad.

Actualmente, las organizaciones dedicadas a la producción de semen bovino, en general nacionales y extranjeras, no realizan esta técnica como rutina en la evaluación del semen, porque no les aporta, a su criterio, nada importante. Sólo a requerimiento del interesado y

previo al inicio del desarrollo de una IATF, se suele realizar al semen a utilizar en la misma, un TTR.

En la actualidad, se han encontrado resultados contradictorios con esta prueba, lo que ha hecho perder cierta confiabilidad a la misma. Sin embargo, no debe interpretarse que esto signifique que debamos descartarla. Quizá sí, prestarle atención, a otros parámetros a tener en cuenta, como:

-Comportamiento del semen a la observación directa, descongelar y evaluar de inmediato morfología espermática incluyendo el PAI.

Como norma general, no se debería tomar una determinación sobre el futuro de un material seminal, por el resultado de uno solo de esos controles mencionados. Lo correcto es analizar el promedio de todos ellos y decidir en consecuencia. Como mínimo se deberán repetir las evaluaciones con otras dosis del mismo semen y, seguramente, más de una vez se presentarán sorpresas inesperadas, al obtener resultados diferentes con respecto al primer control. Reiterando, lo correcto es evaluar los resultados de las diferentes pruebas realizadas y en base a ello tomar una decisión, siempre teniendo en cuenta que no existe ningún examen *in vitro* que esté altamente correlacionado con la fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2000).

Métodos Objetivos: Se trata de pruebas de valoración o análisis que no dependen del criterio del observador. Algunas son utilizadas en el trabajo de rutina de un Centro de I.A., que cuenta con el equipamiento adecuado y otras son aplicadas en los trabajos de investigación.

-Fertilización “*in vitro*” (FIV): Esta técnica permite medir la capacidad fecundante del espermatozoide “*in vitro*”, en presencia del gameto de la hembra. Estos últimos pueden ser de la misma especie (homólogos) o de especies diferentes (heterólogos). En este caso los ovocitos son desprovistos de su membrana pelúcida, por medio de diversas técnicas, para evitar la especificidad de especie de la misma. Se han publicado numerosos trabajos sobre este tema, realizados con semen criopreservado. Su importancia radicaría en lograr el conocimiento de la habilidad fecundante del semen de un reproductor que se incorpora a un centro de I.A.

-Desplazamiento espermático en el mucus cervical: Esta evaluación “*in vitro*” aparece como confiable, dado que la velocidad de desplazamiento del espermatozoide en el mucus cervical está correlacionada con la fertilidad de las hembras.

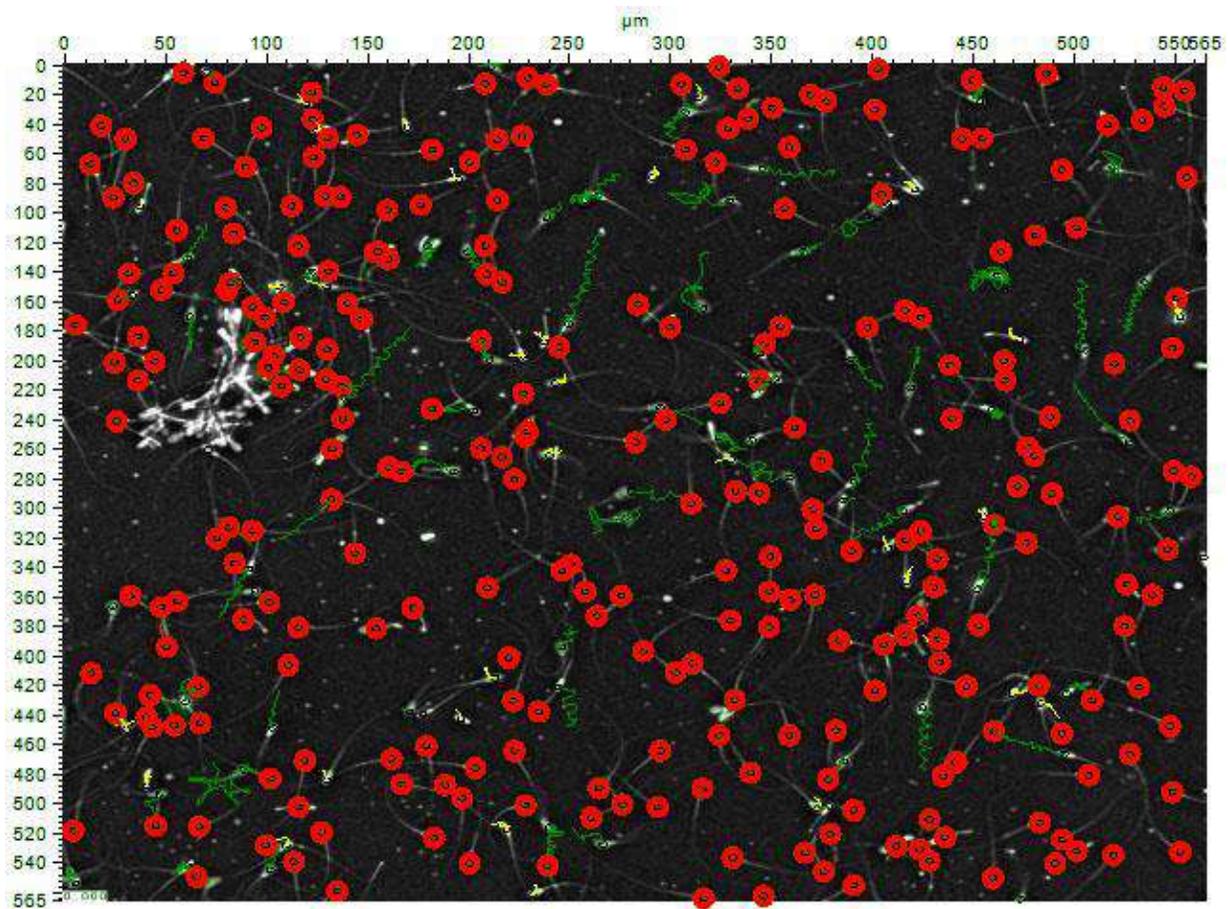
-Análisis automático computarizado de espermios: En la actualidad se dispone de nuevas técnicas analíticas basadas en programas informáticos C.A.S.A., que permiten una valoración objetiva del semen. La incorporación de estos sistemas en la rutina del laboratorio disminuye, en gran medida, el factor subjetivo del análisis convencional, lo que garantiza una mayor correlación con la capacidad fecundante de un eyaculado. La valoración del semen mediante el sistema C.A.S.A., se realiza con el AndroVision de Minitüb / Alemania, que integra los análisis clásicos del sistema C.A.S.A. con otros métodos más avanzados para valorar la funcionalidad de los espermatozoides. La concentración y la motilidad, así como la integridad y viabilidad espermática pueden ser evaluadas con precisión y rapidez, analizando hasta 500 células por campo:

-Motilidad espermática total

- Motilidad progresiva (con determinación de la trayectoria de la cabeza y movimiento de la cola espermática).
- Motilidad local (movimiento en círculo)
- Concentración espermática.
- Morfología espermática.
- Morfometría espermática, para el cálculo del porcentaje de espermatozoides anormales.
- Integridad de membrana: recuento automático del porcentaje de espermatozoides con membrana intacta.
- Integridad de acrosoma: nos brinda el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado.
- Viabilidad espermática.

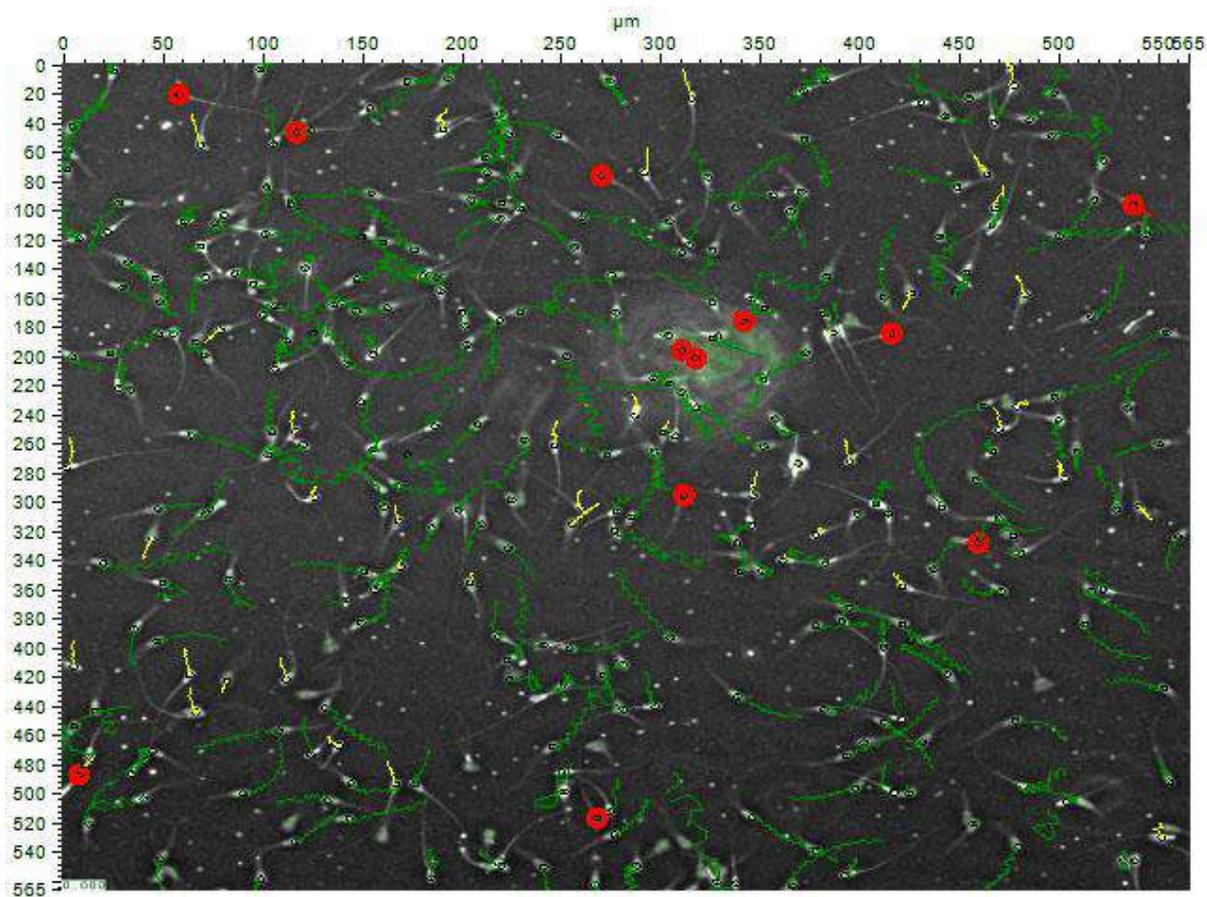
En la figura 18 se muestra la imagen en el monitor que brinda el AndroVision, en una muestra de semen descongelado, con un altísimo porcentaje del 85% de espermatozoides muertos marcados por un círculo rojo. La poca cantidad señalados en verde, son los vivos con motilidad progresiva y, los aglutinados son los muertos sin colorear, que el sistema digital no los reconoce como tal al no tener la forma de una célula espermática.

Figura 18: Muestra de semen descongelado, con un 85% de espermatozoides muertos.



En la figura 19 se observa un material seminal, inmediatamente posterior al descongelamiento, de excelente calidad con un 65% de espermatozoides con motilidad progresiva marcados en verde. Los pintados con amarillo, corresponden a los que tienen motilidad local, dado que es en círculo, no avanzan. Los muertos, en ambas imágenes no se aprecian, porque el círculo rojo que los identifica es en relación al tamaño de los zoides muy grande.

Figura 19: Material seminal de excelente calidad, inmediatamente posterior al descongelamiento con un 70% de espermatozoides con motilidad progresiva



El detalle de los parámetros de motilidad de uso más frecuente que mide C.A.S.A. fueron descritos, *ut supra*, en: Valoración del semen eyaculado / Evaluación objetiva del semen. Sobre la base de lo enunciado, se sostiene con herramientas de calificación más precisas, como las que brinda un sistema C.A.S.A., se asegura:

- El correcto cálculo de dilución de cada eyaculado.
- Un adecuado respeto a los valores umbrales.
- La calidad del material seminal conservado mediante el examen poscongelado.

-El monitoreo, en forma rápida, del comportamiento de los toros del Centro de I.A. a través del tiempo.

-Brinda resultados rápidos, 2” por muestra y de manejo relativamente sencillo.

-Citometría de flujo: Además, de lo mencionado con anterioridad, esta metodología objetiva de la calidad seminal, tiene una alta precisión en la determinación de la viabilidad espermática. Al respecto, Christensen et al, 2005, en un relevamiento realizado en cinco empresas dinamarquesas dedicadas al procesamiento del semen bovino, comprobaron con el empleo de la CF, el valor del coeficiente de variación fue de 0,9 y 1,7 %. para la evaluación de la viabilidad del semen fresco y descongelado, respectivamente.

.Correcta identificación de las dosis de semen congelado: Para poder garantizar la calidad de un trabajo de I.A., la dosis de semen procesado en pajuelas debe presentar una correcta y clara identificación. En ella deben constar:

-Centro de I.A.

-Nombre / Apodo del Toro.

-Raza

-RP / HBA

-Datos de habilitación del reproductor en SENASA

-Fecha de procesado del material seminal.

.Control bacteriológico del semen congelado: Es de suma importancia realizar este control periódico sobre el semen criopreservado, debido a que es una forma de conocer, indirectamente, el nivel de higiene que presenta el Centro de I.A. en el trabajo de su laboratorio. Lo ideal, según la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), es lograr que el 95% de las dosis de semen congelado presenten menos de 500 unidades formadoras de colonias (UFC). Lógicamente que esta meta no es fácil de alcanzar, es fundamental controlar todas las medidas higiénico-sanitarias que, se llevan a cabo por el laboratorio y en el proceso de producción de semen. Se recomienda el control mensual de dos dosis, envasadas en pajuelas, producidas por cada toro en actividad. La clasificación de acuerdo al nivel de UFC/ml se detalla a continuación en el cuadro 7

Cuadro 7: Clasificación del nivel de higiene de los Centros de I.A, considerando la cantidad de UFC por pajuela, según la OIE.

Clase	UFC
I	<500
II	500 – 5.000
III	>5.000

Conclusiones

-La espermatocitogénesis; meiosis y espermiogénesis son las tres divisiones del proceso de la espermatogénesis y están caracterizados por el desarrollo de la espermatogonia, espermatocito y espermátides, respectivamente.

-En el toro estas divisiones toman 21, 23 y 17 días, respectivamente, para una duración total de 61 días.

-En el esperma, los cambios funcionales más importantes ocurren a nivel de los conductos eferentes y cabeza del epidídimo.

-El paso del esperma en los tubos seminíferos hasta su exteriorización como espermatozoide maduro en el eyaculado, es de 8 a 11 días en el toro

- El transporte del esperma a través de los conductos eferentes, es llevado a cabo por las cilias de las células epiteliales y es consumado por la contracción localizada de los músculos lisos de la pared epididimal.

-La cola del epidídimo tiene un importante papel en el almacenamiento de los espermatozoides, donde permanece semanas y mantiene su poder fecundante.

-Dos propiedades importantes, para retener la viabilidad del esperma en la cola del epidídimo, son la temperatura constante siempre por debajo de la testicular y la secreción de proteínas específicas.

- El espermatozoide adquiere la capacidad de moverse progresivamente en el epidídimo.

- El ion Ca^{++} debe estar en concentraciones apropiadas para mantener un perfecto modelo de traslación.

- La motilidad es esencial para la fertilidad, sin embargo, no es indicativa de por sí de la actividad fertilizante, el espermatozoide pierde su capacidad fecundante antes de perder la motilidad.

-La motilidad resulta importante para la penetración del espermatozoide a través del cumulus oophorus y la zona pelúcida del óvulo.

- Con la tecnología microscópica en 3D, con una cámara de altísima velocidad que puede grabar 55000 imágenes por segundo, se comprobó que la motilidad progresiva del espermatozoide se percibe como una hélice cónica similar a un sacacorcho.

- Los cambios medibles asociados con la capacitación son el alto metabolismo y elevación del oxígeno, incremento de la motilidad (hiperactivación) y la remoción del factor de decapitación

- La capacitación espermática incluye dos procesos, la vesiculación de la membrana en la porción anterior de la cabeza que permite la liberación de enzimas proteolíticas, fenómeno conocido como reacción acrosomal y, la motilidad hiperactivada, denominado golpe flagelar o latigazo, con lo que adquiere una potencia incisiva de penetración, cambios asociados con la entrada de Ca^{2+} a la célula espermática y con niveles aumentados del AMP cíclico.

-La capacitación estaría ligada con eventos periovulatorios, de hecho proteínas específicas del oviducto podrían inhibir la reacción acrosomal y la motilidad hiper activada hasta poco antes de la ovulación.

-Para obtener eyaculados de calidad, es fundamental controlar los numerosos factores que interactúan en esta actividad, fundamentalmente el personal afectado a la recolección, instalaciones, manejo de los reproductores, frecuencia de extracciones e infertilidad de verano.

-Considerando la raza y la época del año, los toros Holando son los que, en promedio, presentan una superior calidad con respecto a los Angus y Polled Hereford e inclusive, en menor medida con las índicas.

-Los reproductores *Bos taurus*, son más sensibles a los efectos detrimentales de las altas temperaturas sobre la espermatogénesis, que los *Bos indicus* y sus cruza

-Hay un bajo porcentaje de descarte, tanto de eyaculados como de semen congelado entre otoño a fin de primavera.

-Desde el inicio del verano, comienza a decrecer la calidad del semen, aumentando paralelamente el porcentaje de material seminal descartado.

-En los toros sobrealimentados, excedidos de peso, se depositan excesos de grasa en el cuello del escroto, evitando el intercambio normal de calor, resultando en una espermatogénesis anormal y la posibilidad de una degeneración testicular.

-La gran deposición de grasa alrededor del cono vascular testicular, en el cuello del escroto, es mucho más difícil de eliminar que en otras partes del cuerpo.

-La producción diaria de esperma se refiere, por lo general, al número de espermatozoides colectados por V.A. o E.E. en animales de los que se obtienen eyaculados con frecuencia.

-Los animales que eyaculan con asiduidad evitan que se les tenga que calcular las reservas almacenadas de esperma en la cola epididimal.

-La recolección frecuente reduce la pérdida de semen, por reabsorción en los conductos eferentes dado que tienen la propiedad de fagocitar esperma, además de los que se eliminan por orina y la masturbación.

-El ritmo de las extracciones de semen de un toro, en un centro de I.A. es de dos eyaculados un par de veces a la semana.

-Aumentando la frecuencia de recolección, disminuyen el volumen y la concentración espermática por eyaculado y se puede observar un pequeño incremento en el porcentaje de espermatozoides vivos.

- Los toros adultos tienen eyaculados de mayor volumen, más alta concentración espermática y en consecuencia más elevada producción de espermatozoides totales.

-Hay un efecto aditivo, de las falsas montas y el tiempo dedicado a la preparación del macho dador, en el incremento de la cantidad de espermatozoides recolectados por eyaculado.

-Los reproductores Holando producen eyaculados de más volumen que otras razas carniceras continentales, razas sintéticas e índicas.

-La circunferencia escrotal: está directamente correlacionada con la capacidad de producción diaria de esperma, con los rasgos de buena calidad seminal y fertilidad.

-La valoración subjetiva o convencional de una muestra de semen incluye la determinación de diversos parámetros como: volumen, aspecto, concentración espermática, motilidad/vigor, morfología espermática, porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y presencia de células extrañas. Los resultados obtenidos dependerán de la capacidad y experiencia del técnico que la realiza.

-La implementación de sistemas computarizados, como el C.A.S.A. y la citometría de flujo, disminuyen, en gran medida, el factor subjetivo del análisis convencional, lo que garantiza una mayor correlación con la capacidad fecundante de un eyaculado.

-La evaluación mediante el sistema C.A.S.A., se realiza con un equipo SpermVision, Minitüb-Alemania, donde el programa analiza 10 campos microscópicos diferentes y determina los siguientes parámetros: motilidad total, motilidad progresiva, motilidad local, concentración y morfología espermática.

-La valorización del semen con la citometría de flujo se basa en su potencial multiparamétrico, por el análisis en segundos de miles de espermatozoides.

-Los citómetros más modernos están equipados, con tres laser y al menos diez tubos fotomultiplicadores, lo que permite etiquetar las células al mismo tiempo, permitiendo así el análisis simultáneo de los siguientes parámetros: concentración espermática, viabilidad/mortalidad, integridad del acrosoma, actividad mitocondrial, integridad del ADN y flujo de calcio.

-Se han desarrollado diluyentes de semen bovino de última generación, de muy fácil preparación, basados en el uso de lipoproteínas y lipopolisacáridos de origen vegetal, principalmente a partir de extractos de soja.

-Los diluyentes soja-lecitina (SL) por su transparencia, facilitan un mejor análisis de los espermatozoides al microscopio, al descongelado es mayor la motilidad espermática y las pruebas de fertilidad a campo fueron significativamente más altas ($P < 0.0001$) comparadas con las tasas de NR del diluyente TRIS-EY

-Se está trabajando sobre una nueva técnica de criopreservación de semen denominada VITRIFICACIÓN, como alternativa para evitar o disminuir al máximo el daño espermático en la formación de hielo intracelular durante el congelado profundo.

-Las organizaciones dedicadas a la producción de semen bovino, nacionales y extranjeras, no realizan el test de termo resistencia como rutina en la evaluación del semen, porque no aporta nada importante.

-La Oficina Internacional de Epizootias (OIE), exige producir el 95% de las dosis de semen congelado con menos de 500 unidades formadoras de colonias (UFC)

Para finalizar, a manera de síntesis, se considera importante destacar que en la industria de la I.A. referida a la producción de semen bovino se requiere, además de contar con toros de alto mérito genético e impecable sanidad, el funcionamiento coordinado de un eficiente equipo humano multidisciplinario, la disponibilidad de instrumental de alto nivel tecnológico e instalaciones adecuadas para el manejo de los reproductores.

Bibliografía

Sugerencias: recomendamos al lector, que desee profundizar en los temas aquí sintéticamente descritos, consultar las publicaciones que se mencionan a continuación:

AMANN, R. How a Bull Works. Proceedings 11th Technical Conference on A.I. and Reproduction, Milwaukee, 6-18, NAAB, 1986

AMANN, R. Management of Bulls to Maximize Sperm Output. Proceedings 13th Technical Conference on A.I. and Reproduction. NAAB, 1990

AMANN, R. Anatomy and physiology of the testis and epididymis. Society for Theriogenology, Proceedings for Annual Meeting: 1-7. August, 1991

ANDREOZZI, R. Estimación de un modelo probabilístico para predecir el número de zoides en un eyaculado a partir del Spectronic 20. Dpto de Estadística, CIAVT, Nov., 1990.

BARTH, A. The Pathogenesis Of Abnormal Sperm Production. Proceeding Society for Theriogenology AGM, San Diego, Cal. 85-91, 1991.

BARTH, A., BOWMAN, P. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in Bulls. Can Vet J., 35: 93-102, 1994

BARTH, A., OKO, R. Normal Bovine Spermatogenesis and Sperm Maturation. En Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Chapter 3: 19-88. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1989.

BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs and in the semen as grounds for rejection of breeding bulls for import and export to or from Denmark. Nordisk Veterinaermedicin 35: 105-130, 1983.

BRITO, L. Endocrine Control of Testicular Development and Initiation of Spermatogenesis in Bulls. En Bovine Reproduction, Chapter 4: 30-38, First Edition. Edited by Richard M. Hope. Published by John Willey & Sons, 2015a.

- BRITO, L. Bull Development: Sexual Development and Puberty in Bulls. En Bovine Reproduction, Chapter 5: 41-57, First Edition. Edited by Richard M. Hope. Published by John Willey & Sons, 2015b.
- BRITO, L., SILVA, A., RODRIGUES, L., VIEIRA, F., DERAGON, L., KASTELIC, J. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. Theriogenology, 58(6): 1175-1186, Oct 1, 2002.
- BROGLIATTI, G., GARCÍA MIGLIARO, F., LARRABURU, G., HERRERA, C., TRIBULO, H. Aplicación del análisis computarizado de semen (C.A.S.A.) en la evaluación de la calidad seminal y la fertilidad. Resúmenes VI Simposio de Reproducción Animal, IRAC, Córdoba, página 221, 2005.
- CALAMERA, J. Introducción al estudio del espermatozoide. Editorial Héctor Macchi, Buenos Aires, 1992.
- CHENOWETH, P., RISCO, C., LARSEN, R., VELEZ, J., TRAN, T. & CHASE, C., Jr. Effects of dietary gossypol on aspects of semen quality, sperm morphology and sperm production in young Brahman bulls. Theriogenology, 42: 1-13, 1994.
- CHENOWETH, P., KASTELIC, J. Clinical Reproductive Physiology and Endocrinology of Bulls. En Current Therapy in Large Animal Theriogenology, Chapter 30: 221-227. Edited by R. Youngquist & W.Threlfall, Saunders Elsevier, 2007.
- CHRISTENSEN, P., HANSEN, C., LIBORIUSSEN, T., LEHN-JENSEN, H. Implementation of flow cytometry for quality control in four Danish bull studs. Animal Reproduction Science, 85: 201-208, 2005.
- CIBELLI, J. Spectronic 20-Bausch & Lomb, su regulación. Informe I y II, CIAVT, 1990.
- COULTER, G., KASTELIC, J. Testicular thermoregulation in bulls. Proceedings 15th Technical Conference on A.I. and Reproduction, 28-34, NAAB, 1994.
- COULTER, G., MAPLETOFT, R., KOZUB, G., CATES, W. Scrotal circumference of two-year-old bulls of several beef breeds. Theriogenology, 27: 485-491, 1987.
- DALTON, J., NADIR, S., NOFTSINGER, M. y SAACKE, R. Factores que afectan el resultado de un programa de sincronización de celos. Revista Taurus, Año 13, N° 49: 6-19, Abril, 2011
- DECUADRO-HANSEN, G. Segundo Curso de Evaluación y Congelación de Semen Bovino. CLIA, Urdinarrain, Entre Ríos, 27 y 28 de abril, 2000.
- DEJARNETTE, M. No deje para el verano lo que puede hacer hoy. Infortambo, N° 142: 66-68, Noviembre, 2000.

- EVERETT, R., BEAN, B. Environmental influences on semen output. *J. Dairy Sci.* 65: 1303-1310, 1982.
- FOOTE, R. Factors Influencing the Quantity and Quality of Semen Harvested from Bulls, Rams, Boars and Stallions. XII BIENNIAL SYMPOSIUM ON ANIMAL REPRODUCTION. *J. Animal Sci.* 47: 1-11, Supplement II, 1978.
- FOOTE, R. Circunferencia escrotal en toros *Bos taurus* y *Bos indicus*, su correlación con la producción de semen. Comunicación personal, 1983.
- GADÉLHA, H., HERNANDEZ-HERRERA, P., MONTOYA, F., DARSZON, A., CORKIDI, G. Human sperm uses asymmetries and anisotropic flagellar controls to regulate swimming symmetry and cell steering. *Science Advance*, 6, eaba5168, 2020
- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. Anatomy of Female Reproduction. En *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Chapter 2: 13-29. Edited by B. Hafez /E.S.E. Hafez, Blackwell Publishing, 2008.
- HUNTER, R. El plazo de capacitación en los espermatozoides de los mamíferos: Una reinterpretación. *CADIA*, Vol. 3, N°9, 59-60, 1987.
- JUNE MULLINS, K. y SAACKE, R. Male Reproductive Tracts and Associated Structures. Pages: 1-79. En *Illustrated Anatomy of the Bovine Male and Female Reproductive Tracts. From Gross to Microscopic*. NAAB. Cadmus Professional Communications, Science Press Division. Germinal Dimensions Inc. Blacksburg, Virginia, 2003.
- KASTELIC, J. Termoregulación del testículo del toro. 4° Simposio Internacional de Reproducción Animal: 1-9, IRAC, Córdoba, 2001.
- MATHEVON, M., BUHR, M., & DEKKERS, J. Environmental management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 81: 3321-3330, 1998.
- MAZZEO, R. y MONTI, J. Control del funcionamiento de la termocupla y los tiempos de enfriado. Comunicación personal, Octubre, 2019.
- MILES, P., ALLENDE, R. Calibración de un espectrofotómetro en el laboratorio de inseminación artificial. *Producción Animal*, Buenos Aires, 7: 584-591, 1981.
- MILLAR, P. y RAS, N. SEMEN. En: *Esterilidad reproductiva e inseminación artificial en el ganado bovino*. Capítulo VIII: 195-220, Editorial Guillermo Kraft Ltda., Buenos Aires, 1962.
- MITCHELL, J., SENGER, P., ROSENBERGER, J. Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. *J. Anim. Sci.* 61:956-967, 1985.
- MORTIMER, S. C.A.S.A.: practical aspects. *J. Andrology*, 21:515-524, 2000.
- MURPHY, E., KELLY, A., O'MEARA, C., EIVERS, B., LONERGAN, P. & FAIR, S. Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility

- parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *J. Animal Sci.* 96(6): 2408-2418, Jun, 2018.
- NAAB. Management Guidelines, National Association of Animal Breeders, 2020.
- QUINTERO, V., y RUIZ-CORTES, T. Efectos de la leptina en el inicio de la pubertad de animales machos. *Taurus Año 13 N° 49*: 26-40. Abril, 2011.
- RIZZOTO, G., KASTELIC, J. A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants? *Theriogenology*, 147: 166-175, 2020.
- ROBERTS, S. Infertility in male animals. En *VETERINARY OBSTETRICS AND GENITAL DISEASES. Second Edition*, Chapter XVIII: 604-725. Published by the Author, Ithaca New York, 1971.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Evaluación del semen congelado de toro: métodos tradicionales y de actualidad. V Congreso Argentino de Reproducción Animal. Septiembre, 2000.
- ROLDÁN, R. Fisiopatología de la Reproducción e Inseminación Artificial. Curso para graduados. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 1975
- ROMANO, J., BRINSKO, S. Reproductive Physiology of the Male. En *Cunningham's Textbook of VETERINARY PHYSIOLOGY*, Sixth Edition, Chapter 40: 471-480. Edited by Bradley G. Klein, Elsevier, Inc, 2020
- RUTTER, B., RUSSO, A. Examen Especial. En *Bases para la Evaluación de la Aptitud Reproductiva del Toro. Segunda Edición*, Capítulo 4: 65-101, Editorial Agro Vet, Buenos Aires, 2006.
- RYAN, P. Endocrine and Exocrine Function of the Bovine Testes. En *Bovine Reproduction*, Chapter 2: 11-25, First Edition. Edited by Richard M. Hope. Published by John Willey & Sons, 2015.
- SAACKE, R. Semen quality in relation to semen preservation. *J. Dairy Sci.* 66: 2639-2646, 1983.
- SAACKE, R. Ultraestructura de la cabeza del espermatozoide. Anormalidades espermáticas, defectos compensables y no compensables. Comunicación personal, 6 de setiembre, 1986.
- SARA, R. y DURAND, M. Consideraciones para interpretar los valores de un informe de evaluación de calidad seminal de pajuelas. CRB, 2009.
- SEKONI, E., GUSTAFSSON, B. Variaciones estacionales en la incidencia de anormalidades morfológicas espermáticas en toros lecheros usados regularmente para inseminación artificial. *CABIA*, 16: 8-14, Junio, 1989.
- SIMMET, C. El principio básico: un concepto científico. *Tecnología de Reproducción Animal, Porcino-Minitüb*, 12, 2015

SNOJ, T., KOBAL, S., MAJDIC, G. Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different Bos taurus breeds in a 31-year retrospective study. Theriogenology, 79(5): 847-852, Mar 15, 2013.

VINCENT, P., UNDERWOOD, S., DOLBEC, D., BOUCHARD, N., KROETSCH, T. & BLONDIN, P. Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. En Bovine Reproduction, Chapter 74: 685-695, First Edition. Edited by Richard M. Hope. Published by John Willey & Sons, 2015.

YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. En The Physiology of Reproduction. Chapter 5, 189-262, Second Edition, edited by E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, Ltd., New York, 1994

Agradecimientos: los autores agradecen la excelente e invaluable colaboración de las siguientes personas:

Dra Lucía Andreozzi, Investigadora Asistente CONICET, por el análisis de datos.

Sra Paula Fontana, Labcolor-Óptica Lunetts, por la digitalización de imágenes.

Dr Sebastián Arisnabarreta Dupuy, Bayer Crop Science, por el aporte informático y asesoramiento en traducciones.

Sr Jonatan Cuesta, CIAVT, por el soporte informático.

Med. Vet. Raúl Mazzeo y Sr Juan Monti, CIAVT, por la información de AndroVision.