

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN SEMINAL EN TOROS POR MÉTODOS MANUALES O  
COMPUTARIZADOS**

por

Guzmán CUBAS NORANDO

TESIS DE GRADO presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias

Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Estudio de caso

MONTEVIDEO

URUGUAY

2013

# **PÁGINA DE APROBACIÓN**

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:           Dr. Alvaro Lopez

Segundo Miembro:           Dr. Daniel Cavestany  
(Orientador)

Tercer Miembro:           Dra. Carolina Viñoles

Cuarto Miembro:           Dr. Danilo Fila  
(Coorientador)

Fecha:                        24 de Julio de 2013

Autor:                        Guzmán CUBAS NORANDO

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Daniel Cavestany por su tutoría y gran apoyo en la enseñanza durante éste camino.

Al Dr. Danilo Fila, Dra. Daniela Crespi y al resto del equipo de la Cátedra de Teriogenología por su dedicación y apoyo.

A la Dra. Andrea Pinczak, Dra. Carmen de Olarte y personal de Gensur por su gran colaboración durante el ensayo experimental.

A la querida barra de amigos de siempre y a los que tuve la fortuna de conocer, que siempre han estado.

A mis abuelas, mis tíos, primos y a Juan, Guillermina y Guadalupe.

A la familia Zunini-Castro y a Iris la abuela de Martin que desde el primer momento me hicieron sentir como en mi casa.

A mis tutores de la vida Germán, Gastón y Guille.

A mis grandes maestros Papá y Mamá.

## TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	1
AGRADECIMIENTOS .....	2
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS .....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
Recordatorio Anatómico .....	9
Desarrollo Embrionario y Diferenciación Sexual .....	14
Control Endocrino del Sistema Reproductor del Macho .....	17
Hormona GnRH .....	17
Hormonas Gonadotrópicas .....	18
Esteroides Gonadales .....	19
Espermatogénesis .....	20
Espermatozoides y Plasma Seminal .....	22
Componentes y Propiedades del Semen.....	22
Morfología del espermatozoide.....	25
Composición Química de los Espermatozoides .....	27
Componentes Inorgánicos de los Espermatozoides .....	28
Componentes Bioquímicos del Espermatozoide.....	28
Evaluación Seminal.....	29
Pruebas para evaluar la Calidad Seminal .....	30
Controles Macroscópicos .....	32
Controles Microscópicos.....	33
B-Sperm Software .....	43
El Semen y sus diferencias entre razas.....	52
HIPÓTESIS .....	55
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS .....	56
Animales y Manejo .....	56
Equipo .....	56
Estudio Morfológico .....	57
Análisis Estadístico .....	57
RESULTADOS.....	58
Comparación entre el equipo SQA y la evaluación manual de semen de toro .....	58
DISCUSIÓN.....	61

CONCLUSIONES .....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Aparato reproductor del macho y sus funciones (Senger, 2003).....	10
Figura 2. Espermatogénesis y sus fases, tipos celulares que aparecen secuencialmente (Senger, 2003) .....	21
Figura 3. SQA-Vb .....	40
Figura 4. Tecnología de lectura del capilar de SQA-Vb .....	42
Figura 5. Pasos y demostración de componentes del proceso.....	43
Figura 6. B-Sperm Software y captura de imagen de material seminal. ....	43
Figura 7. Comparación del análisis de Concentración y espermatozoides totales entre SQA y método manual .....	58
Figura 8. Comparación del análisis de Motilidad entre los dos métodos en estudio .....	59
Figura 9. Morfología comparativa expresada en % de espermatozoides normales .....	60
Cuadro 1: La evaluación subjetiva de la densidad.....	33
Cuadro 2: Escala de valores en motilidad de masa. ....	33
Cuadro 3: Escala de valores en densidad.....	34
Cuadro 4. Escala de valores que describe el porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.....	36
Cuadro 5: Valores fisiológicos de anomalías en el toro.....	48
Cuadro 6. Características de los eyaculados de acuerdo al sistema de evaluación.....	58
Cuadro 7. Correlación entre ambos métodos .....	59
Cuadro 8. Evaluación morfológica.....	60

## RESUMEN

La evaluación de semen de toro es un proceso imprescindible para determinar su congelación e implica determinar la concentración y estimar la calidad y vitalidad de los espermatozoides en un eyaculado. El objetivo fue comparar concentración y motilidad seminal, evaluadas por métodos tradicionales (concentración por conteo directo y motilidad por apreciación visual) con los obtenidos por un equipo computarizado, SQA-Vb. El ensayo se realizó en el centro de toros Gensur y se evaluaron 116 eyaculados de 5 razas (Holando, Jersey, Polled Hereford, Aberdeen Angus y Red Angus). El método de colecta fue mediante vagina artificial en su mayoría a excepción de un toro que fue colectado con electroeyaculador. El estudio morfológico del semen se realizó en el Laboratorio del Departamento de Reproducción de la Facultad de Veterinaria bajo la técnica de formol salino bufferado en microscopio de contraste de fase a 100x. Para este análisis se evaluaron 93 eyaculados de los mismos animales antes mencionados. El porcentaje de motilidad espermática obtenido por SQA-Vb fue de 67,4% y por apreciación visual de 68,8% ( $P < 0,0001$ ). Lo mismo ocurrió con la concentración y el total de espermatozoides por eyaculado en la cual se obtuvo una correlación de 0,866 para la primera y de 0,928 para la segunda ( $P < 0,0001$ ). El promedio de espermatozoides normales fue de 84,9% para la técnica de formol salino bufferado y de 84,8% para SQA-Vb. No hubieron diferencias significativas para ambas variables ( $P < 0,09$ ) con una correlación  $r = 0,17753$ . Se puede concluir que el equipo SQA-Vb tiene una precisión similar a los métodos tradicionales para la evaluación seminal.

## **SUMMARY**

Evaluation of bull semen is an unpredictable process to determine its quality and involves (among others) determining the concentration and estimate the quality and vitality of the sperm in an ejaculate. El objective was to compare seminal concentration and motility, evaluated by traditional methods (concentration by direct counting) and motility by visual appreciation with those obtained by a computerized equipment, SQA-Vb. The trial was conducted in Gensur Bull Center and 116 ejaculates of 5 breeds (Holstein, Jersey, Polled Hereford, Aberdeen Angus and Red Angus) were evaluated. The method of collection was through artificial vagina with the exception of a bull that was collected with electroejaculator. The semen morphological study was carried out in the laboratory of the Department of Reproduction of the Veterinary Faculty under the technique of formol saline buffered in 100 x phase contrast microscope. Ninety three ejaculates of the same above mentioned animals were evaluated for this analysis. Sperm motility percentage obtained by SQA-Vb was 67.4% and by visual appreciation of 68.8% ( $P > 0.1$ ). Same thing happened with the concentration and the total number of sperm in the ejaculate with a correlation of 0.866 for the first and 0.928 for the second ( $P < 0.0001$ ). Normal sperm averaged 84.9% for the technique of saline buffered formalin and 84.8% for SQA-Vb. There were no significant differences for both variables ( $P > 0.09$ ) with a correlation  $r = 0.17753$ . It can be concluded that the SQA-Vb team has similar accuracy to traditional methods for seminal.



## INTRODUCCIÓN

La fertilidad masculina es un factor importante en la reproducción del bovino dado que un solo toro se utiliza generalmente para servir numerosas vacas especialmente después de la introducción de la inseminación artificial. La evaluación de la fertilidad masculina se basa principalmente en la evaluación de semen usando parámetros convencionales tales como la motilidad, la morfología, viabilidad, las estimaciones bioquímicas de enzimas, y la integridad acrosomal de la membrana.

Entre estos, la motilidad es una de las características más importantes asociadas con la capacidad de fertilización de los espermatozoides por lo que sigue siendo el parámetro de elección para determinar el grado de daño causado en el esperma por el procedimiento de criopreservación. La motilidad del esperma es ampliamente evaluada mediante evaluación visual en un microscopio equipado con óptica de contraste de fase. Sin embargo, debido a la subjetividad de la técnica, ha sido una predicción pobre de potencial de fertilidad (Liu et al., 1988; Fitzpatrick et al., 2002; Holroyd et al., 2002).

Exámenes de animales machos se hacen para dos propósitos principales: o bien para determinar si se puede esperar fertilidad normal del animal, o para el diagnóstico de infertilidad. En cualquier situación, los requisitos son una historia del animal, un examen general, un examen detallado del tracto genital, la observación de la cópula, la posterior recogida y evaluación del semen (Arthur et al., 2001).

La evaluación de semen de toro es un proceso imprescindible para determinar su congelación e implica determinar la concentración y estimar la calidad y vitalidad de los espermatozoides en un eyaculado. La concentración de espermatozoides se puede realizar manualmente, mediante conteo de espermatozoides por unidad de volumen, o por espectrofotómetros adecuadamente calibrados. La calidad del eyaculado se determina por el estudio microscópico de los espermatozoides, generalmente mediante un microscopio de contraste de fases a aumentos de 100x, donde se determina el porcentaje de formas normales o anormales. La determinación de la vitalidad del espermatozoide se realiza estimando el porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo en un microscopio simple o de contraste de fase, siendo este método subjetivo y por tanto sujeto a variaciones de acuerdo a la idoneidad y experiencia del evaluador.

La evaluación de la motilidad ha sido una técnica propensa a subjetividad (Walker et al., 1982), y la visualización de los enfoques puede variar entre los evaluadores dentro de la industria. Ya en 1957, las evaluaciones demostraron ser pobres estimadores de la motilidad (Baker et al., 1957). Makler (1978) declaró que este método tiene un valor muy limitado en estudios clínicos y no era adecuado para la investigación. Freund (1966) demostró que incluso los laboratorios de investigación de esperma no podrían producir en consonancia resultados en la evaluación morfológica espermática (Walker et al., 1982). La motilidad individual ha sido utilizada desde la década de 1600, y la movilidad sigue siendo el principal control de calidad para las organizaciones de procesamiento de semen.

El análisis computarizado de semen fue propuesto por primera vez por Dott y Foster (1971) en el que varios parámetros como la concentración, la motilidad y la morfología se pueden analizar mediante el procesamiento de imágenes digitales de los espermatozoides (Kathivaran et al., 2011). Recientemente se han desarrollado equipos electrónicos que, mediante un software adecuado, calculan en forma automática la concentración y vitalidad del semen.

Por todo lo anteriormente mencionado nos planteamos comparar el análisis de semen mediante evaluación manual y subjetiva, con un método computarizado y objetivo como lo es el caso del equipo en estudio SQA-Vb.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Recordatorio Anatómico**

La producción de espermatozoides potencialmente fértiles y su adecuado depósito en el aparato reproductor de la hembra son las funciones naturales del toro (Salisbury, 1978). El sistema reproductor masculino está formado por el cordón espermático, testículo, epidídimo, glándulas sexuales accesorias y el pene. El testículo produce espermatozoides y testosterona, así como otras sustancias como la inhibina, el estrógeno y una variedad de proteínas. El epidídimo proporciona el entorno para la maduración final de los espermatozoides y sirve como un órgano de almacenamiento para estas células. Las glándulas sexuales accesorias producen plasma seminal y el pene es el órgano copulador (Senger, 2003).

## Testículos y Escroto

Los órganos sexuales masculinos principales son los dos testículos que en los mamíferos se hallan localizados en una bolsa externa llamada escroto. El escroto es un saco bilobulado que contiene los testículos; se halla situado en la región inguinal entre los muslos, inmediatamente detrás de las tetillas rudimentarias. Con sus músculos, revestimientos fibrosos y piel externa, soportan los testículos, los protegen y ayudan a que mantengan una temperatura más baja que la del interior del abdomen que se requiere para una espermatogénesis adecuada.

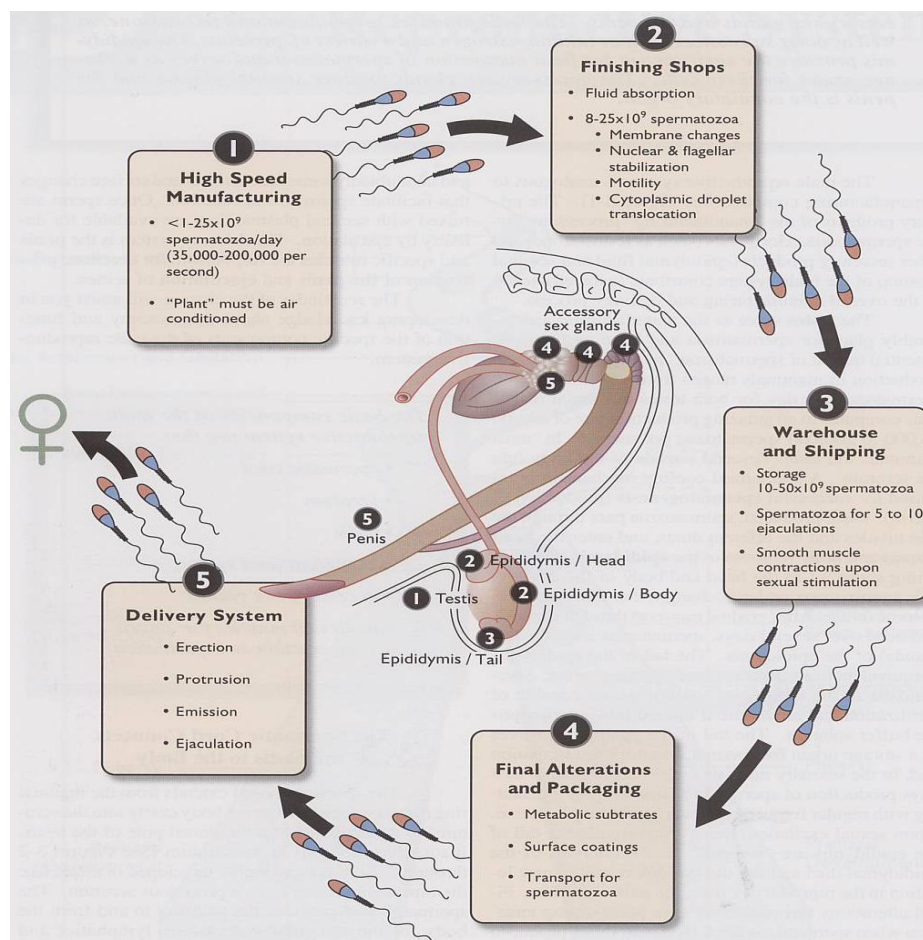


Figura 1. Aparato reproductor del macho y sus funciones (Senger, 2003)

Los testículos tienen dos funciones en los machos adultos, la primera es la producción de espermatozoides vivos potencialmente fértiles, y la segunda es la formación de los andrógenos testosterona y androstenediona. Es un cuerpo oval y alargado, suspendido dentro de la bolsa escrotal por el cordón espermático, que tiende a llevar el borde libre anterior del testículo ligeramente hacia abajo o en una posición ventral. Se halla revestido por una delgada capa de tejido conjuntivo elástico, la túnica albugínea (Salisbury, 1978), que está formada principalmente por series entremezcladas de fibras de colágeno (Figura 1).

Para funcionar correctamente los testículos de los mamíferos deben mantenerse a una temperatura menor que la del resto del cuerpo (Hafez, 2002). La temperatura constante, media del gradiente entre las temperaturas orgánica y escrotal, se mantiene en los machos normales mediante la acción termorreguladora de la musculatura de la túnica dartos. Esta acción termorreguladora no comienza hasta que el animal no llega a la pubertad y está regulada por las hormonas testiculares. Un factor que contribuye al enfriamiento o calentamiento de la sangre arterial que llega a los testículos es el mecanismo de intercambio térmico realizado por la posición de la arteria testicular y el plexo venoso pampiniforme que la rodea, separados solamente por tejido conjuntivo dentro del cordón espermático (Salisbury, 1978).

El cordón espermático está formado por el músculo cremáster interno, los vasos y nervios que recorren el testículo en la doble capa de mesórquico (doble capa de peritoneo que une al testículo abdominal con el peritoneo parietal y se continúa con la túnica vaginal propia) y el conducto deferente. La arteria espermática se origina en la aorta posterior. La vena espermática forma el plexo pampiniforme, que rodea a la arteria cuando sale del testículo. Los nervios del testículo provienen del plexo mesentérico posterior y renal del sistema autónomo. El testículo no tiene nervio sensorial propio pero la túnica vaginal refleja le suministra nervios sensoriales desde el tercer nervio espinal lumbar (Arthur, 1991).

### *Epidídimo*

El epidídimo, un conducto que parte de los conductos eferentes en la parte dorsal del testículo, se considera dividido en tres partes: la cabeza, el cuerpo y la cola (Salisbury, 1978). En su cabeza, una cantidad variable de conductos eferentes se unen al conducto epididimario. Ésta forma una estructura aplanada, es uno de los polos testiculares; el estrecho cuerpo termina en el polo opuesto en la amplia cola. El conducto contorneado del epidídimo es muy largo, la pared del conducto tiene una notable capa de fibras musculares circulares y un epitelio pseudoestratificado de células cilíndricas. Hay una disminución progresiva de la altura del epitelio y los enterocilios, y ensanchamiento de la luz a través de los tres segmentos. Los dos primeros segmentos se encargan de la maduración de los espermatozoides, mientras que el terminal se destina a su almacenamiento. La maduración de los espermatozoides ocurre durante el tránsito por el epidídimo; la motilidad aumenta a medida que aquellos entran en el cuerpo de éste. El ambiente de las células espermáticas en la cola del epidídimo proporciona factores que favorecen la capacidad fecundante.

La cola es el principal órgano de almacenamiento, contiene alrededor del 75% de las células espermáticas alojadas en el epidídimo. Los espermatozoides almacenados en las ampollas constituyen sólo una pequeña parte de las reservas extragonadales totales (Hafez, 2002).

### *Órganos genitales internos*

Los órganos genitales internos comprenden las vesículas seminales, la ampolla, la próstata, las glándulas bulbo-uretrales y la uretra pélvica (Arthur, 1991). Además de aportar un medio líquido para el transporte de los espermatozoides, la función de las glándulas accesorias es incierta, aunque se sabe mucho acerca de los agentes químicos específicos que proporcionan al semen que se eyacula (Hafez, 2002). Proporcionan la mayor parte del plasma seminal, contiene abundantes carbohidratos, citratos, proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles y minerales, y posee una capacidad tampón relativamente alta, sirviendo este plasma especialmente para mantener los procesos vitales de los espermatozoides (Salisbury, 1978).

El plasma seminal no es necesario para la fertilidad, pero es importante para la inseminación natural donde se necesita un vehículo fluido para la entrega de los espermatozoides (Senger, 2003).

Las ampollas son las terminaciones dilatadas de los deferentes y cada una entra en la uretra por la abertura común con la vesícula seminal del mismo lado, en éstas se almacena la porción espermática que procede de los testículos y del epidídimo.

Las vesículas seminales se encuentran en posición lateral respecto a las porciones terminales de cada conducto deferente, son compactas y lobuladas en rumiantes (Hafez, 2002). Son activamente secretoras y su secreción contiene una cantidad elevada de fructosa y ácido cítrico (Salisbury, 1978). El conducto de las vesículas seminales y el conducto deferente suelen compartir un conducto eyaculatorio común que se abre en la uretra (Hafez, 2002).

La glándula prostática está íntimamente relacionada con la uretra intrapélvica y está dividida en dos partes (Arthur, 1991). El cuerpo de la próstata se sitúa dorsalmente a la unión de la uretra pelviana con el cuello de la vejiga. El resto de la glándula, el pars disseminata, rodea la uretra pelviana, siendo más gruesa en la cara dorsal que en la ventral (Salisbury, 1978). Presenta una secreción acuosa (Arthur, 1991), y se cree es rica en minerales (Senger, 2003).

Las glándulas bulbouretrales o de Cowper, están situadas a ambos lados de la uretra pelviana, unos centímetros por detrás de la próstata y se hallan parcialmente enterradas en el músculo bulbocavernoso. Cada una de ellas vierte su secreción en la uretra a través de un orificio simple. Producen una sustancia lubricante viscosa, de aspecto de moco (Salisbury, 1978). Su secreción acuosa se elimina antes del coito y se considera que así limpian la uretra de los restos de orina (Arthur, 1991).

### *Pene y prepucio*

El pene se compone de tres partes. Estas partes son la base (raíz) del pene donde se une al arco isquiático, el eje (la parte principal del pene), y el glande del pene que es el extremo distal especializado. El glande está repleto de nervios sensoriales y es el homólogo del clítoris femenino. La estimulación del glande del pene es el principal factor para iniciar los mecanismos de la eyaculación.

En especies con pene fibroelástico, hay una flexura sigmoidea. Ésta es una configuración en forma de S a lo largo del eje del pene. La flexura sigmoidea permite que el pene se retraiga dentro del cuerpo hasta que se produce la erección. La erección es rígida sin un cambio significativo en el diámetro. La flexura sigmoidea es mantenida por un par de músculos lisos conocido como músculos retractores del pene. Estos se adjuntan dorsalmente a la vértebra coccígea y unida ventralmente a los lados ventrolaterales del pene. Cuando se contrae, el músculo retractor del pene tiene el pene dentro de la vaina y cuando se relaja, protruye el pene. El eje del pene tiene un área de tejido esponjoso y eréctil conocida como el cuerpo cavernoso que constituye la mayor parte del interior del pene. En la parte ventral del pene que rodea la uretra peneana es otra área de tejido eréctil esponjoso llamado cuerpo esponjoso. La erección en el toro, jabalí, carnero, caballo y camélidos se produce por una combinación de la relajación de los músculos retractores del pene y el flujo de la sangre en los cuerpos cavernosos y el cuerpo esponjoso (Senger, 2003).

La estimulación sexual produce dilatación de las arterias que riegan los cuerpos cavernosos del pene. El enderezamiento del pene en los rumiantes es causado por el músculo isquiocavernoso, que bombea sangre desde los espacios cavernosos de las raíces hacia el resto del cuerpo cavernoso del pene (Hafez, 2002).

## **Desarrollo Embrionario y Diferenciación Sexual**

La embriogénesis de la hipófisis y los tractos reproductores masculino y femenino es una serie muy coordinada de eventos que implican la fusión de varios tipos de tejidos que al final dan la forma completa a las glándulas reproductoras y órganos (Senger, 2003).

El periodo de embrión, que en la vaca se sitúa arbitrariamente como el intervalo entre los días 13° y 45° de gestación, se caracteriza principalmente por el comienzo de la formación de la mayoría de los órganos y partes corporales (Salisbury, 1978).

La diferenciación es el proceso por el que un grupo de células no especializadas se desarrollan en un grupo funcional, reconocible de células que tienen una función común. Las capas germinales que aparecen antes de la fijación del embrión en el útero, son el endodermo, mesodermo y ectodermo.

El endodermo es la capa interior celular del embrión y eventualmente da lugar al tracto digestivo, hígado, páncreas, pulmón y órganos endocrinos. El ectodermo se desarrolla a partir de las células externas de la masa celular interna. El ectodermo dará lugar al sistema nervioso central, los órganos de los sentidos, las glándulas mamarias, las glándulas sudoríparas, la piel, el cabello, las uñas y pezuñas. La capa media del embrión se conoce como el mesodermo. El mesodermo se desarrolla entre el ectodermo y el endodermo. Esta capa germinal da lugar a los sistemas circulatorio, esquelético, muscular y urinario. La mayor parte del sistema reproductor se deriva a partir del mesodermo.

En el embrión temprano (primer 15% de la gestación), cuando el saco vitelino todavía está presente, se desarrollan las células germinales primordiales. Estas células se originan en el revestimiento interior del saco vitelino. Las células germinales primordiales migran por un movimiento ameboide desde el saco vitelino en el intestino posterior y finalmente residen en la gónada indiferenciada. El sexo del embrión no es evidente en la gónada indiferenciada. La gónada indiferenciada se encuentra en la superficie interior de la pared dorsal del cuerpo y se conoce en este momento como la cresta genital. Eventualmente, se forman las gónadas en el macho o en la hembra.

La mayoría de las células germinales primordiales pueblan la cresta genital, durante el tiempo que están colonizando las crestas genitales, están experimentando mitosis y su número aumenta de manera significativa. Cuando las células germinales primitivas llegan a la cresta genital, se estimula el tejido conectivo local para proliferar. Esto resulta en la formación de filamentos compactos de tejido llamados cordones sexuales primitivos, éstos cordones proliferan en las crestas genitales para ampliar y empujar hacia el riñón en desarrollo.

Durante su desarrollo, el embrión utiliza tres sistemas de origen renal morfológicamente distintos. El llamado pronéfrs primero, es un remanente no funcional de una forma primitiva de fundaciones de riñón en los animales inferiores. Temprano en la embriogénesis, se da la regresión del pronéfrs y se sustituye por una pareja funcional, bilateral de los riñones intermedios conocidos como los mesonéfrs. El mesonéfrs produce orina que es drenada por un par bilateral de conductos, conductos mesonéfricos. Estos conductos se llamaban conductos de Wolff. Los conductos mesonéfricos se extienden caudalmente y desembocan en el seno urogenital. Cuando transcurre un 10% a 15% de la gestación la forma final de riñón comienza a aparecer. Esta forma renal final se conoce como los metanefros. Se van a desarrollar nefronas funcionales y servirá como la forma funcional del riñón en mamífero adulto. El metanefros se vuelve funcional por el primero 30% a 35% de la gestación.

Al mismo tiempo, que el mesonefros está en desarrollo, un nuevo par de conductos al lado de los conductos mesonéfricos comienzan a desarrollarse. Estos conductos se llaman conductos paramesonéfricos o conductos de Müller. A pesar de que el conducto mesonéfrico y los conductos paramesonéfricos están ambos presentes, el embrión no está comprometido con respecto a su sexo en este momento. La diferenciación sexual de los órganos en sí todavía no ha ocurrido. Esta etapa se conoce como la etapa sexualmente indiferente porque la discriminación morfológica entre el embrión macho y hembra no se pueden realizar por simple observación (Senger, 2003).

El aparato reproductor del macho se deriva principalmente de los conductos de Wolff, que se han diferenciado a su vez en las crestas genitales del embrión primitivo. Los órganos sexuales del embrión se distinguen hacia el día 45° de gestación, pero el desarrollo del aparato reproductor prosigue y la relación de las diferentes partes se modifica a lo largo de la vida fetal y del comienzo de la postnatal hasta la pubertad (Bloom-Fawcett, 1995).



Los cromosomas sexuales dentro de los espermatozoides determinan si el embrión se convertirá en un macho y el desarrollo de los testículos o si se convertirá en una hembra y desarrollará los ovarios. La sustancia que controla la vía hacia el desarrollo ya sea macho o hembra se llama factor determinante del testículo (TDF) y es controlado por el cromosoma Y. Cuando el factor determinante del testículo es sintetizado por los cordones sexuales dentro de la gónada primitiva, el desarrollo del sistema reproductor masculino es estimulado. En ausencia de TDF se da el desarrollo de un sistema reproductor femenino. En el embrión macho, las porciones del riñón mesonéfrico son adecuadas para su uso en el tracto reproductivo aproximadamente al mismo tiempo que los conductos paramesonéfricos comienzan a degenerarse. Entre 5 y 15 túbulos mesonéfricos penetran en la gónada primitiva y hacen conexiones con los cordones sexuales primitivos a través de la red testicular. La rete testis es una red de pequeños conductos que conectan los túbulos seminíferos a los conductos eferentes. Los conductos eferentes se derivan de los túbulos mesonéfricos. El conducto mesonéfrico dará lugar al epidídimo y conducto deferente. En conjunto, los conductos eferentes, el epidídimo y el conducto deferente se las apropiaron para convertirse en el sistema de conductos excurrentes extragonadales del aparato reproductor masculino.

Los testículos son formados en el nivel de las costillas y descienden al escroto al final de la gestación. En primer lugar, los testículos deben recorrer una distancia sustancial desde la posición retroperitoneal en la cavidad del cuerpo en el escroto. Este movimiento implica el crecimiento rápido seguido de rápida regresión de una estructura ligamentosa llamada el gubernaculum. El segundo reto en la comprensión del proceso de descenso implica comprender cómo dos capas de peritoneo cubren los testículos y descienden con él. Estas dos capas, la túnica vaginal visceral y la túnica vaginal parietal están separadas por una cavidad vaginal que es continua con la cavidad peritoneal.

El gubernaculum se extiende caudalmente y reside en el área del escroto futuro. A medida que el cuerpo fetal crece los testículos son empujados contra el peritoneo. Este empuje hacia fuera hace que el peritoneo se envuelva alrededor de la gubernaculum y los testículos (Senger, 2003). Los testículos se desarrollan en el interior del abdomen, en posición medial respecto al riñón embrionario (mesonefros). Dentro del testículo, el plexo de conductos se conecta a los túbulos mesonéfricos y de este modo al conducto mesonéfrico, para formar el epidídimo, conducto deferente, y la glándula vesicular.

Las glándulas prostática y bulbouretral se forman a partir del seno urogenital embrionario, y el pene se genera por tubulización y alargamiento de un tubérculo que se desarrolla en el orificio del seno urogenital (Hafez, 2002).

### **Control Endocrino del Sistema Reproductor del Macho**

En el macho normal, el testículo es una glándula par, de doble función, endocrina (producción de hormonas) y exocrina en la elaboración de células sexuales o gametos masculinos (Cavestany, 1986).

El proceso de la espermatogénesis se halla bajo control endócrino. Las principales glándulas implicadas son la pituitaria y los testículos, también pueden intervenir las glándulas adrenales y posiblemente la glándula tiroides aunque en papeles secundarios (Salisbury, 1978).

El hipotálamo integra estímulos del SNC y es generalmente considerado el regulador de la actividad testicular. A diferencia de lo que sucede en hembras (ciclicidad), en el macho la función endócrina es tónica. Esto se debe a que los andrógenos producidos y liberados por el feto antes del nacimiento, destruyen el centro cíclico sexual del hipotálamo, permaneciendo activo solo el centro tónico. La actividad sexual de macho es tónica y constante (Cavestany, 1986).

Para el funcionamiento testicular normal se requiere de estimulación hormonal por gonadotropinas adenohipofisarias, las cuales a su vez son controladas por la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo (Hafez, 2002).

#### Hormona GnRH

La hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH es un decapeptido secretado por el hipotálamo que desempeña un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la reproducción; como su nombre lo indica la función más conocida es el control de la secreción de las hormonas gonadotrópicas como la hormona luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH) (Ungerfeld, 2002).

La GnRH se libera al sistema porta-hipofisario desde el hipotálamo en forma de pulsos leves, desde donde alcanzan los gonadotrofos de la hipófisis anterior y promueven la descarga pulsátil de LH y FSH. La retroacción de las hormonas hipofisarias no está muy clara, lo que sí está establecido es la acción de las hormonas testiculares sobre el hipotálamo.

La testosterona (T) ejerce una retroacción negativa en el hipotálamo, disminuyendo la tasa de secreción de GnRH. La testosterona es la hormona circulante, pero a nivel central es aromatizada en 17 B-estradiol que es en definitiva la hormona que actúa a nivel del hipotálamo, por lo tanto las hormonas responsables de la retroacción serían los estrógenos en vez de la testosterona (Cavestany, 1986).

### Hormonas Gonadotrópicas

Como su nombre lo indica juegan un rol fundamental en la estimulación de las gónadas; son las principales mediadoras del sistema nervioso central sobre las actividades endócrinas y gametogénicas de las gónadas (Ungerfeld, 2002). Su secreción está regulada por la hormona GnRH y los esteroides gonadales (Hafez, 2002). Mientras que los retrocontroles de las gónadas sobre la FSH, ejercidos por el estradiol, progesterona, inhibina, activina y folistatina, actúan primariamente a nivel hipofisario, la mayoría de los retrocontroles sobre la LH se efectúan a nivel hipotalámico, modulando la liberación de GnRH (Ungerfeld, 2002).

Un aumento inicial de FSH entre los 3 y 5 meses de edad en toros resulta en una proliferación de células de Sertoli, alargamiento del túbulo seminífero y en un aumento en el diámetro del túbulo. En consecuencia, hay un aumento en el tamaño testicular a esta altura. Al mismo tiempo, aumenta la secreción de LH, la cual resulta en una mayor producción de testosterona por las células de Leydig. Entre los 5 y 8 meses de edad la FSH y LH permanecen bajas y luego aumentan nuevamente junto con el comienzo de la pubertad. Se ha demostrado recientemente que mientras mayor sea el aumento de LH a los 3-5 meses de edad, antes se producirá el comienzo de la pubertad y mayor será el tamaño de los testículos al año de edad (datos no publicados). Por esto, se podría especular que las condiciones ambientales, las cuales interfieren con la salud o con el crecimiento de los terneros durante este período crítico, podrían resultar en pubertad atrasada y en tamaño testicular reducido en el toro de 1 año (Barth, 1999).

## Esteroides Gonadales

### *Célula de Leydig*

La función endocrina del testículo reside fundamentalmente en las células intersticiales de Leydig, éstas sintetizan y liberan la hormona sexual masculina testosterona, que es necesaria en una concentración local alta para mantener la espermatogénesis de los túbulos seminíferos (Bloom y Fawcett, 1995). La producción de testosterona por parte de la célula de Leydig es controlada por una gonadotropina, la LH, antiguamente llamada hormona estimulante de las células intersticiales. La testosterona producida por la célula de Leydig llega hasta el túbulo seminífero tanto por difusión simple como por difusión facilitada. Las altas concentraciones de testosterona en el túbulo son necesarias para que ocurra una adecuada espermatogénesis, especialmente para que transcurra correctamente la meiosis. También alcanza rápidamente el torrente sanguíneo donde resulta de importancia para el desarrollo y mantenimiento de la libido, la actividad secretoria de los órganos sexuales accesorios y las características sexuales secundarias asociadas al fenotipo masculino, tales como el aumento de la masa muscular y esquelética (Ungerfeld, 2002).

### *Célula de Sertoli*

Es la única célula somática dentro del túbulo seminífero, esta célula en gran medida dicta el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis y está regulada por la T y FSH (Cavestany, 1986). El túbulo seminífero está compuesto de una membrana basal y una capa de epitelio seminífero. El túbulo está rodeado por células peritubulares contráctiles. Su contracción y el flujo de fluido segregado por las células de Sertoli le permite al recién formado espermatozoide moverse en los túbulos rete.

El epitelio seminífero consta de dos grandes regiones conocidas como el compartimiento basal y el compartimiento ad luminal. Las células de Sertoli se anclan a la membrana basal y rodean el desarrollo de la población de células germinales.

Estas células son las únicas células somáticas en el epitelio seminífero. Una vez se creía que eran simplemente un componente de apoyo a los elementos germinales, ahora se consideran ser los gobernadores celulares de la espermatogénesis. Cada célula de Sertoli aloja un número máximo de células germinales en desarrollo, característico de una especie dada. Por lo tanto, los testículos con un alto número de células de Sertoli son capaces de producir grandes cantidades de espermatozoides.

A la inversa, los testículos con un bajo número de células de Sertoli sólo pueden producir un pequeño número de espermatozoides. Las células de Sertoli son análogas a las células de la granulosa del folículo ovárico. Sin embargo, a diferencia de las células de la granulosa, la célula de Sertoli contiene receptores para FSH y T (Senger, 2003).

Ciertas evidencias sugieren que la FSH estimula la célula de Sertoli a secretar estrógenos por conversión de la T que proviene de la célula de Leydig. La FSH induce a la célula de Sertoli a producir una proteína ligadora de andrógeno, que es secretada en los espacios intercelulares del epitelio seminífero y en la luz del túbulo seminífero. La función de esta proteína es probablemente mantener las altas concentraciones de andrógeno que existen en los túbulos seminíferos, que resultan importantes tanto para el desarrollo normal de la espermatogénesis como para la actividad general de la célula de Sertoli. También produce inhibina, una hormona proteica que tiene un efecto supresor de la secreción de FSH, su acción ocurre probablemente en forma directa sobre las células gonadotropas de la hipófisis (Ungerfeld, 2002).

## **Espermatogénesis**

Se puede definir como el desarrollo de la célula germinal masculina en el mamífero adulto, o como la suma de las transformaciones que resultan en la formación de espermatozoos a partir de espermatogonias, al mismo tiempo que se mantiene constante la cantidad de éstas últimas (Cavestany, 1986).

La espermatogénesis es el proceso de producir espermatozoides, tiene lugar dentro de los túbulos seminíferos y consiste en la suma de todas las transformaciones celulares en el desarrollo de las células germinales que se producen en el epitelio seminífero.

El proceso de la espermatogénesis se puede subdividir en tres fases. La primera fase, consiste en todas las divisiones mitóticas de espermatogonias. Varias generaciones de espermatogonias son sometidas a divisiones mitóticas, generando una gran cantidad de B-espermatogonias. Una parte importante de la fase de proliferación es la renovación de células madre (Figura 2).

La segunda fase de la espermatogénesis se denomina la fase meiótica e implica espermatocitos primarios y secundarios. Durante la fase meiótica, la diversidad genética está garantizada por la replicación del ADN y cruzamientos. Desde un punto de vista genético no son dos espermatozoides idénticos. A modo de conclusión de la fase meiótica (la segunda división meiótica) produce espermátidas haploides. La tercera fase de la espermatogénesis o final es la fase de diferenciación. No hay más divisiones celulares durante esta fase. Durante la fase de diferenciación, una espermátida indiferenciada esférica sufre una transformación notable que resulta en la producción de un espermatozoide completamente diferenciado altamente especializado que contiene una cabeza (material nuclear), un flagelo que incluye una pieza intermedia (con una hélice mitocondrial) y una pieza principal. Las células germinales más inmaduras (espermatogonias) se encuentran en la periferia de un túbulo seminífero cerca de la membrana basal. Como éstas células germinales deben proliferar y madurar se mueven hacia el lumen. Grupos de espermatogonias, espermatocitos o espermátidas están conectados por puentes intercelulares, por lo que el citoplasma de una célula de cohorte completa (grupos de células del mismo tipo) está interconectado. El número exacto de células germinales que están interconectadas no se conoce, pero puede acercarse a 50. El significado de estos puentes intercelulares no se entiende completamente. Sin embargo, sí proporcionan comunicación entre las células y pueden contribuir al desarrollo sincronizado de una cohorte (Senger, 2003).

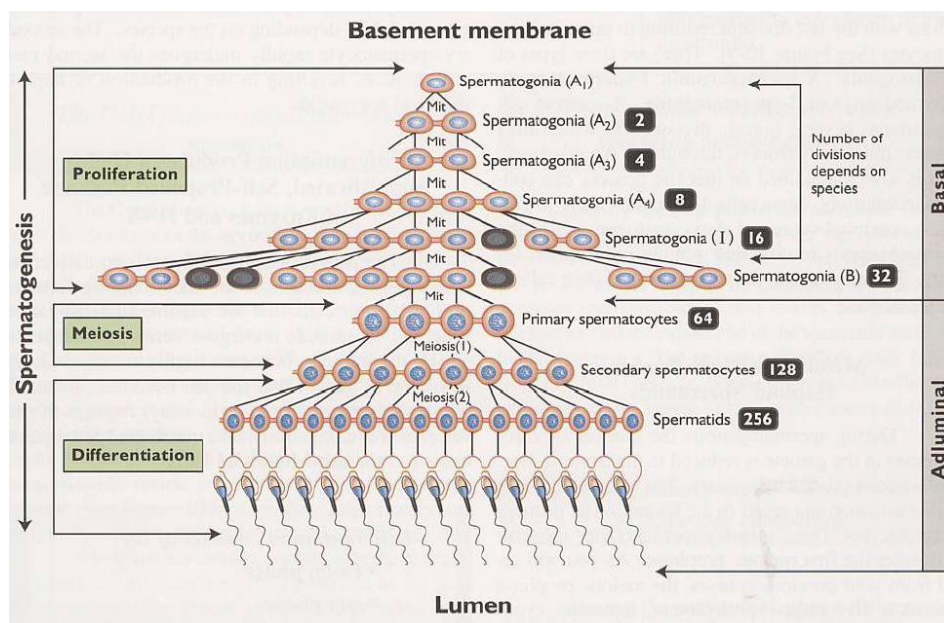


Figura 2. Espermatogénesis y sus fases, tipos celulares que aparecen secuencialmente (Senger, 2003)

## **Espermatozoides y Plasma Seminal**

### *Semen*

A medida que el esperma va pasando por los conductos excretores se le añaden las secreciones de los conductos y glándulas accesorias y el producto final es el semen (Bloom-Fawcett, 1968). El semen es el líquido descargado por el macho durante el coito (Arthur, 1991). Es la suspensión líquida celular que contiene los gametos masculinos y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida de dicha suspensión se conoce como plasma seminal (Hafez, 2002).

### Componentes y Propiedades del Semen

#### *Olor*

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

#### *Color*

La mayor parte de los sémenes de toro son blanco lechosos, variando hacia un color crema, aunque algo más del 10% producen un semen que es normalmente amarillo. Corneo (1940) ha estudiado el pigmento responsable del color, llegando a la conclusión de que el color amarillo es un carácter normal del semen de muchos toros, que no altera las células espermáticas y que carece de influencia en la fertilidad. Piensa que es un lipocromo derivado del epitelio de la ampolla, pero no está influido por el tipo de alimentos ingeridos (Salisbury, 1978).

A veces el semen es de color verdoso, lo cual indica la existencia de procesos necrotizantes, de carácter purulento, causados por algún órgano del aparato genital masculino. El semen puede estar coloreado de rojo vivo por la presencia de sangre cuando hay heridas recientes en el prepucio, el glande o la uretra, a menudo producidas durante la recolección artificial (Bonadonna, 1989).

### *Volumen*

El volumen del eyaculado varía con los distintos toros y en diferentes momentos para cada toro. En general el volumen aumenta con la edad y el tamaño corporal del toro y se modifica con su salud y vigor reproductor y con la frecuencia de servicios. Los toros jóvenes, inmediatamente de su entrada en servicio, producen solamente 1 a 2 mililitros o menos en cada eyaculado de semen, mientras que los toros totalmente desarrollados y vigorosos producen 10 a 15 mililitros e incluso más en cada eyaculado (Salisbury, 1978).

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

La comprobación del volumen directamente en un tubo graduado suele inducir errores, bien por la presencia de burbujas de aire, o por la inexactitud de la propia escala del tubo. El volumen se expresa en ml (Bonadonna, 1989). El volumen se observa directamente sobre el tubo graduado, teniendo en cuenta que un toro mayor de 2 años debe tener un eyaculado de no menos de 4 ml. El volumen puede variar entre 2 y 12 ml.

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

El régimen sexual tiene una importancia concreta, donde la notable hiperexcitación durante la época de servicios a veces hace aumentar el volumen del eyaculado por la abundancia de la secreción glandular secundaria. En ese caso, el semen asume casi siempre un carácter típicamente filamentosos. También el estímulo precoital prolongado favorece de la misma manera el aumento volumétrico del eyaculado (Roberts, 1979). La alimentación solo con forraje seco puede reducir la masa eyaculada que, en cambio, generalmente aumenta con el alimento verde. Roux relaciona la cantidad de semen eyaculado con el peso vivo y suministra los siguientes datos: por 100 kg de peso vivo; toro 0,6 mL (Bonadonna, 1989).



### *Densidad y Viscosidad*

Los datos de Allard (1947) indican una correlación positiva fuertemente significativa con la concentración de células espermáticas. Ciertos datos revelan que el peso específico de la célula espermática varía de 1,240 a 1,334 y que el del plasma seminal es de 1,005, lo que explica la correlación positiva entre el peso específico y la concentración de las células. La viscosidad aumenta con el incremento de la concentración de células espermáticas. Está fuertemente correlacionada con la concentración de células espermáticas, pero no con la viscosidad del plasma seminal tras la eliminación de las células (Salisbury, 1978).

### *pH*

La mayoría de las muestras seminales normales están cerca de la neutralidad con una pequeña tendencia a la acidez, variando entre un pH de 6,5 a 6,9, pudiendo estar en un rango que va desde menos de 6 hasta un máximo de 8, o levemente por encima de este valor. El semen de buena calidad es usualmente más ácido (pH menor) que las muestras de semen con baja concentración de semen. Normalmente el semen de calidad pobre contiene proporcionalmente más contenido de fluido proveniente desde las glándulas uretrales y accesorias.

Dado que los espermatozoides en condiciones anaerobias como por ejemplo en los tubos de recogida, descomponen la fructosa del semen en ácido láctico, el pH disminuye probablemente entre el tiempo transcurrido desde la recogida a su determinación. A la inversa puede suceder con aquel semen que es contaminado bacteriológicamente y contiene muchos espermatozoides muertos, que producen amoníaco, lo que causará un aumento en el pH. Por otro lado, el semen colectado por medio de la vagina artificial usualmente tiene menor pH que el semen que es colectado por medio del masaje rectal. En este último método, el pH ronda en un rango de 7.5 a 8. Eyaculaciones sucesivas tienden a aumentar el pH, y el semen que no contiene espermatozoide, provenientes de toros que tienen inflamación de los epidídimos, o el semen obtenido por medio de la vasectomía, tienden a tener niveles de pH mayores (Salisbury, 1978).

### *Presión Osmótica*

La presión osmótica es la presión que debe aplicarse a una solución para que se mantenga en equilibrio con el agua pura cuando la solución y el agua se hallan separadas por una membrana semipermeable.

Dado que es difícil medir con seguridad la presión osmótica, se determina la disminución del punto de congelación de las soluciones o mezclas, una propiedad que depende también de la concentración de partículas. Una solución molal disminuye el punto de congelación del agua en  $-1,86^{\circ}\text{C}$ . Salisbury et al., (1948) hallaron que la disminución del punto de congelación de la sangre de toro y del semen recientemente eyaculado era la misma, de  $-0,56^{\circ}\text{C}$ , lo que dividiéndolo en  $-1,86$  da una presión osmótica de 0,3 lo que corresponde a 300 miliosmoles, lo que es equivalente a un valor de 7,5 atmósferas para la presión osmótica del semen de toro a  $37^{\circ}\text{C}$ . Cuanto mayor concentración de células espermáticas del semen, más rápidamente aumenta la magnitud de la depresión del punto de congelación. Toros de fertilidad baja tienen un semen con un punto de congelación inferior al normal (Salisbury, 1978).

#### *Capacidad de Tamponamiento*

Se debe a la capacidad química de un líquido para absorber o eliminar ácido o álcali con escasa modificación del pH, el semen de toro es relativamente muy tamponado a valores de pH que oscilan por debajo de 5,5 o por encima de 9,0. Carece de capacidad de tamponamiento entre 6,5 y 8,0, y por entre éstos valores que se encuentran los valores de pH de las muestras normales. La capacidad de tamponamiento del líquido de la vesícula seminal es muy similar a la del semen, lo que hace considerar que una parte considerable de dicha capacidad se debe a la secreción del órgano (Salisbury, 1978).

#### *Conductividad Eléctrica*

El semen de toro es conductor de la corriente eléctrica debido a la presencia de iones ácidos, básicos o electrolitos. Rothschild (1948) utiliza esta propiedad del semen y su impedancia, que resulta de las ondas de espermatozoides que pasan entre los polos, como una medida indirecta de la calidad del semen (Salisbury, 1978).

#### Morfología del espermatozoide

El espermatozoide maduro es una célula con motilidad activa, que se desplaza libremente en el líquido y consiste en una cabeza que contiene un núcleo con todos los rasgos genéticos que un padre le puede transmitir a su descendencia, y una cola o flagelo, que le proporciona la motilidad necesaria para su transporte al lugar donde se efectúa la fertilización y procura que su orientación sea la adecuada para penetrar a través de las capas que recubren el óvulo (Bloom y Fawcett, 1968).

### *Cabeza*

En mamíferos domésticos el núcleo es oval y aplanado y está rodeado por una membrana nuclear (Senger, 2003). La característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (ADN) y una clase especial de proteínas básicas llamadas portaminas espermáticas. Su número cromosómico y, por tanto, el contenido de ADN nuclear es haploide, o sea posee la mitad de los cromosomas de la especie en cuestión. La naturaleza espermática se debe a las divisiones celulares meióticas que ocurren durante su formación (Hafez, 2002).

### *Acrosoma*

La caperuza acrosómica o acrosoma, recubre alrededor del 60% de la parte anterior del núcleo. Consiste en una estructura de doble membrana formada por una membrana interna y otra externa (Senger, 2003). El acrosoma es un lisosoma unido a la membrana que contiene enzimas hidrolíticas. Estas enzimas, acrosina, hialuronidasa, zona lisina, esterases e hidrolasas ácidas, son necesarias para la penetración de las inversiones celulares y la zona pelúcida del ovocito ovulado. Durante la fertilización del acrosoma se somete a un ordenante, exocitosis altamente especializado, conocido como la reacción acrosómica, que permite la liberación de las enzimas que están envasados en ella para digerir o penetrar en la zona pelúcida (Senger, 2003). El segmento ecuatorial del acrosoma es importante debido a que es esta parte del espermatozoide, junto con el segmento anterior de la región post acrosómica, la que se fusiona inicialmente con la membrana del oocito durante la fecundación (Hafez, 2002).

### *Cola*

La cola de los espermatozoides es un flagelo con alimentación propia (Senger, 2003). Las principales regiones de la cola, comenzando desde la cabeza, son la pieza intermedia, la pieza principal de la cola y la pieza terminal. Desplazándose longitudinalmente a través del centro de la cola, se halla el haz de fibras axilares que contienen los elementos de la motilidad (Salisbury, 1978). La cola está formada por el cuello y el segmento medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que empalma en una depresión en el extremo posterior del núcleo. La placa basal del cuello es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola.

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

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

El segmento caudal o terminal, posterior a la terminación de la vaina fibrosa, contiene solo el axonema central cubierto por la membrana plasmática. El axonema es el que da la motilidad al espermatozoide. Los pares externos de microtúbulos del patrón 9 + 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes. La gota protoplasmática o citoplasmática, que suele desprenderse de los espermatozoides tras el eyaculado, está compuesta de citoplasma residual. Aunque se le considera anormal en los espermatozoides eyaculados de la mayor parte de las especies, puede retenerse en la región del cuello, donde se conoce como gota proximal, o cerca del anillo citoplasmático, donde se le denomina gota distal (Hafez, 2002).

### Composición Química de los Espermatozoides

Los principales componentes químicos de los espermatozoides son ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Cerca de un tercio del peso seco de una célula espermática corresponde al núcleo. La cromatina nuclear está constituida por proporciones aproximadamente iguales de ADN y proteína. El casquete acrosómico contiene una variedad de enzimas. En la cola hay muchas proteínas estructurales, enzimas, así como lípidos (Hafez, 2002).

### Componentes Inorgánicos de los Espermatozoides

Los espermatozoides son ricos en fósforo, nitrógeno y azufre. La mayor parte del fósforo está asociada al ADN, mientras que el azufre se deriva de proteínas nucleares básicas, y de los componentes de la cola (Hafez, 2002).

### Componentes Bioquímicos del Espermatozoide

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

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

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

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

Los nucleótidos adenina y guanina, ricos en energía son componentes importantes de la energética espermática, como lo son también las proteínas del axonema, tubulina y dineina. Se ha demostrado que la dineina espermática, que es la principal proteína en los brazos de los microtúbulos axonémicos, es una ATPasa activada por cationes divalentes (Hafez, 2002).

## **Evaluación Seminal**

Para poder fertilizar, un espermatozoide debe estar vivo, ser móvil y tener una morfología razonablemente normal. Estas son características importantes que conforman el componente compensable de la calidad seminal.

En la IA, las deficiencias seminales que llevan a fallas en la fertilización han sido definidas como compensables cuando son eliminadas o marcadamente reducidas al incrementar el número de espermatozoides en la dosis inseminante. Mientras que las deficiencias son no compensables cuando los espermatozoides son capaces de recorrer el tracto femenino, llegar al sitio de fertilización, pero son incompetentes para llevar a cabo la misma y/o sostener el desarrollo embrionario.

Las pérdidas de preñez por deficiencias no compensables deberían ser consideradas intrínsecas al toro y deberían ser únicamente minimizadas por el descarte del macho o del semen (Saacke, 2003).

Barth (1999), considera necesario incluir en la evaluación de los reproductores un análisis de semen. Según su teoría, entre un 15-20% de los toros que superan los exámenes mencionados, tienen una calidad seminal no satisfactoria; bajo esta denominación incluye reproductores estériles, infértiles y subfértiles. Este criterio es compartido por Coulter quién sostiene además que estos toros deprimirían la fertilidad del rodeo (Acuña et al., 2001). Las características seminales como concentración espermática, motilidad progresiva, concentración de proteína seminal, y proporción de espermatozoides con estructura normal aumentan hasta por lo menos 4 meses después del comienzo de la pubertad. Unos meses pueden hacer que haya una gran diferencia en la calidad y cantidad de semen que produce un toro de 1 año (Barth, 1999).

Los toros que están atravesando la pubertad tienen grandes cantidades de diferentes anomalías espermáticas, incluyendo gotas proximales. Es interesante destacar que en toros maduros, una alteración en espermatogénesis frecuentemente resulta en un espermograma similar, es decir, grandes cantidades de anomalías diferentes incluyendo gotas proximales. Entonces, espermatogénesis anormales en toros púberes pueden tener una base algo similar a la de toros maduros con espermatogénesis alteradas.

Se dice que encontrar gotas proximales en el semen de toros jóvenes es “un signo de inmadurez”. Algunos han malinterpretado esto como que las células espermáticas son inmaduras y no que el toro es inmaduro.

Cuando el semen de toros jóvenes se analiza en evaluaciones de aptitud reproductiva, es tentador, a veces, clasificar a un toro con grandes cantidades de anomalías espermáticas y gotas proximales como un reproductor potencialmente satisfactorio con la esperanza de que éste vaya a producir semen normal cuando sea utilizado en el servicio (Barth, 1999).

### **Pruebas para evaluar la Calidad Seminal**

Luego de haber obtenido un eyaculado aproximadamente normal, se le puede realizar y de manera satisfactoria, un correcto examen de calidad de semen luego de un leve período posterior a su colecta. La evaluación del semen es indicio de fertilidad, pero no prueba de ella (Roberts, 1979).

La Sociedad Americana de Teriogenología y la Asociación Canadiense Occidental de profesionales vinculados a los bovinos, manejan ciertos protocolos para la evaluación de la solidez de toros, que son ampliamente utilizados por los veterinarios de América del Norte. En estos protocolos, solidez física, la integridad del tracto reproductivo y evaluación del semen se evalúan, y el toro es clasificado como dudoso, satisfactorio o insatisfactorio criador potencial. Entre los rasgos evaluados durante un buen estado de reproducción, se evalúan la circunferencia escrotal (CE) y la calidad del semen, puntos finales (tales como la motilidad y morfología) están altamente correlacionados con la fertilidad (Menon et al., 2011).

La fertilidad masculina es un factor importante en la reproducción de bovinos y más aun sabiendo que un solo toro se utiliza para numerosas vacas, más que nada luego de la introducción de la inseminación artificial.

La evaluación de la fertilidad masculina se basa principalmente en la evaluación del semen después de la descongelación usando parámetros convencionales tales como motilidad de los espermatozoides, la morfología, viabilidad, las estimaciones bioquímicas de la liberación de la enzima, la membrana y la integridad del acrosoma (Kathivaran et al, 2011).

Una vez obtenido el eyaculado éste debe ser bien protegido y manejado hasta posteriormente examinarlo. Hay ciertos factores a tener en cuenta para el adecuado manejo del material seminal como:

1. El recipiente empleado para la colecta mediante electroeyaculación o la vagina artificial debe encontrarse limpia y libre de contaminantes que puedan causar daño alguno a los espermatozoides, como alcohol, excesiva vaselina o lubricante (carboximetilcelulosa), polvo presente en las camisas de primer uso de goma, y antisépticos o sustancias químicas cualquiera sea su clase.
2. Al momento de la colecta, ser precavido en que la vagina se contamine de suciedad o desechos como esmegma y secreciones, pelo prepuciales, agua u orina que producen daño en los espermatozoides.
3. La presencia de sangre o suero pueden causar muerte de los espermatozoides.
4. Enfriamiento o sobrecalentamiento de forma brusca puede llegar a causar daño en los espermatozoides.
5. Realizar excesivo sacudimiento o agitación también puede afectar la integridad de los espermatozoides.
6. Hay que evitar la exposición directa del material seminal al sol, para esto es conveniente utilizar unas camisas protectoras del tubo de colecta.

La muestra de semen es importante que sea examinada lo antes posible luego de la colecta.

Con la correcta utilización del microscopio óptico muchos veterinarios de campo expertos en la práctica pueden realizar mediante procedimientos o técnicas simples de laboratorio, inclusive en el mismo establecimiento rural o lugar de colecta, tres o cuatro pruebas del material seminal de un macho para así poder predecir su fertilidad, y a veces con mayor precisión que un laboratorio.



Siempre es importante hablar con el dueño de los reproductores o con el encargado que siempre está en contacto con el semental, a modo de obtener información e historia del macho. El veterinario puede tener información adicional, por ejemplo sobre el deseo sexual, frecuencia del servicio, comportamiento durante el acoplamiento a raíz del cuidadoso examen físico que puede realizar y que en el laboratorio no conoce (Roberts, 1979). En este análisis, como en el caso de otras técnicas de laboratorio, hay que evaluar cuidadosamente los resultados sobre la base de la observación obtenida y de lo que se sabe respecto del caso; no se debe otorgar mucho crédito a los resultados del análisis efectuado sobre un solo eyaculado.

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

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

Los métodos convencionales para el análisis de semen, incluyendo evaluación del semen motilidad, son subjetivos. Variaciones en el entorno del 30-60% han sido reportados en evaluaciones subjetivas microscópicas del semen humano y animal en los mismos eyaculados (Awad, 2011).

### Controles Macroscópicos

Una vez realizada la colecta de semen, posteriormente a recibir la copa, el tubo o la bolsa de polietileno protegida de la luz solar y el shock térmico, se le realizan ciertos controles macroscópicos. Se evalúa el volumen, color, aspecto, pH, inmediatamente. Es común esperar de toros jóvenes y sin experiencia volúmenes relativamente bajos, entre 2 y 4 cc (Cuenca et al., 1986). Se toman como parámetros normales para volumen valores de entre 4 y 10 cc (Cavestany, 1994).

Las variaciones de color y aspecto están dadas por la concentración espermática o por elementos extraños como sangre, pus, orina, pelos o pigmentos (Cuenca et al., 1986).

Cuadro 1: La evaluación subjetiva de la densidad.

<b>Cre moso:</b>	1.000.000 esp./mm <sup>3</sup> o más
<b>Le choso:</b>	de 500.000 a 800.000 esp./mm <sup>3</sup>
<b>Aguachento</b>	de 100.000 a 300.000 esp./mm <sup>3</sup>

(Cuenca et al., 1986)

### Controles Microscópicos

#### *Actividad Cinética*

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

Método: colocar una gota de semen en un portaobjeto limpio, seco y entibiado a 37°C y observar en el microscopio con objetivo panorámico.

Cuadro 2: Escala de valores en motilidad de masa.

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

### *Densidad*

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

Cuadro 3: Escala de valores en densidad.

<b>Símbolo</b>	<b>Denominación</b>	<b>Características (espermatozoides/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Interpretación</b>
<b>DD</b>	Densísimo	más de 1.500.000	Espermatozoides superpuestos
<b>D</b>	Denso	800.000 a 1.500.000	Sin espacios entre espermatozoides
<b>SD</b>	Semidenso	500.000 a 800.000	Espacio de una cabeza entre espermatozoides
<b>R</b>	Ralo	200.000 a 500.000	Espacios libres amplios
<b>OS</b>	Oligospermia	menos de 200.000	Separados por grandes espacios
<b>A</b>	Azoospermia	ausencia de espermatozoides.	No se observan

### *Motilidad individual*

La motilidad del esperma es una de las características más importantes asociado a la capacidad fecundante del semen, y por muchos años se ha reconocido como esencial para el transporte de espermatozoides y la fertilización en el tracto reproductor femenino (Januskauskas et al., 1999; Versteegen et al., 2002).

Es una de las características más importantes asociados con la capacidad de fertilización de los espermatozoides y es una expresión de su viabilidad e integridad estructural, a su vez sigue siendo el parámetro de elección para determinar el daño que causa en el esperma el procedimiento de criopreservación. Se puede evaluar mediante evaluación visual con el uso de microscopio óptico con contraste de fase, pero debido a la subjetividad de la técnica ha sido un mal predictor de la fertilidad (Kathivaran et al., 2011). En un estudio realizado por Awad (2011), concluyó que la media de la motilidad espermática total en el semen fresco fue del 82,3% y luego de la criopreservación del semen, se disminuyó a valores del 75,8%.

No todos los autores consideran de fundamental importancia práctica a la determinación del tipo y grado de movimiento de los espermatozoides. En rigor, el estado dinámico de por sí no basta para asegurar que también se haya conservado el poder fecundante, aunque un estado citodinámico irreversible siempre es expresión de muerte.

Solo la verificación de una cinética alterada, con numerosos elementos inmóviles o escasamente móviles, expresa un reducido o nulo poder fecundante, especialmente cuando se trata de evaluar material seminal congelado, en el cual la relación proporcional entre espermatozoides móviles que recuperan el movimiento (revitalización) y los que permanecen inmóviles, asume un significado determinante.

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

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

Interpretación de tipos de movimientos:

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

#### 1) Movimiento rotatorio o circular

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

#### 2) Movimiento oscilatorio

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

#### 3) De retroceso

Lo presentan los espermatozoides cuyas colas se encuentran enroscadas sobre sí mismo. En general los movimientos de retroceso son rápidos o rapidísimos.

A veces se establece alternándose con movimientos de quietud más o menos prolongados. Dicho movimiento está vinculado con una malformación caudal que no excluye la simultánea lesión cefálica, y por lo tanto los espermatozoides con esta cinética deben considerarse en estado de irreversibilidad. (Bonadonna, 1989).

Cuadro 4. Escala de valores que describe el porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.

<b>Escala</b>	<b>Descripción</b>
<b>5/5</b>	80 a 100 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.
<b>3/5</b>	60 a 80 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.
<b>3/5</b>	40 a 60 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.
<b>2/5</b>	20 a 40 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.
<b>1/5</b>	20 o menos de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.

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

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

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

##### *CASA*

Desde hace varias décadas, varios investigadores han dedicado tiempo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Fruto de estas investigaciones fue el desarrollo de los sistemas computarizados para el análisis de la motilidad espermática (Holt y Van Look, 2004). El análisis informático del semen fue propuesto por primera vez por Dott y Foster (1971) en el que varios parámetros como la concentración, la motilidad y la morfología se pueden analizar mediante el procesamiento de imágenes digitales de los espermatozoides.

El analizador de semen asistido por método computarizado (CASA) proporciona información precisa y exacta sobre diferentes características de los espermatozoides en movimiento (Gravance y Davis 1995; Holt y Palomo 1996; Kathivaran et al., 2011).

El sistema CASA consiste en un microscopio conectado a una cámara de video, una tarjeta de fotograma de videgrabadora y un ordenador. Los espermatozoides se perciben normalmente usando un campo oscuro / negativo de contraste de fase / microscopio óptico de fluorescencia. En campo oscuro, microscopio de contraste de fase negativo, las cabezas blancas de espermatozoide se visualizan sobre un fondo oscuro y el brillo de la cabeza del espermatozoide se utiliza para establecer posiciones centroide en campos sucesivos. En microscopía óptica fluorescente, la cabeza del espermatozoide se identifica mediante la tinción con un colorante fluorescente que se une al ADN de espermatozoide. Recientemente, el microscopio de luz ha sido probado para el sistema CASA con mejor imagen y un algoritmo de espermatozoide de seguimiento especial (Nafisi et al., 2005).

La cámara de video capta las imágenes de microscopio de los espermatozoides que luego digitalizadas por el ordenador basado en números de elementos de imagen (píxeles) cubiertos por la cabeza del espermatozoide. El usuario puede definir el rango de píxel cubierto por cabezas de los espermatozoides para diferentes especies. Para reducir el error como resultado de los desechos en el rango de píxeles dado, diferentes sistemas CASA pueden utilizar diferentes enfoques (Kathivaran et al., 2011)

Los usuarios pueden seleccionar la velocidad de adquisición de recorrido (número de fotogramas por segundo analizados) y el número total de cuadros analizados hacen que las células de espermatozoide puede ser seguido con éxito para su inclusión en el análisis de movimiento. Los usuarios también pueden definir diferentes reglajes (intensidad, los valores de tamaño), que son esenciales para discriminar entre cabezas de los espermatozoides de los desechos / otras células presentes en la muestra que está siendo evaluada.

Ajustes del instrumento en el análisis de la muestra, el número de campos y de las muestras examinadas, temperatura a la que se realizan las medidas, el método de procesamiento de semen para CASA y muchos otros factores pueden influir drásticamente en los resultados (Davis y Katz 1993; Mortimer, 1997; Kathivaran et al., 2011).

La fiabilidad, la exactitud y precisión del análisis CASA bajo diversas condiciones experimentales dependen en gran medida de la experiencia y formación de los usuarios sobre determinados aspectos como la calibración, validación, optimización de estandarización anuncio del procesamiento de semen antes del análisis (Verstegen et al., 2002; Kathivaran et al., 2011).

En resumen el sistema CASA consta de varias unidades independientes: un microscopio de contraste de fase conectado a una cámara de video, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada a una computadora, de donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de un segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que pueden aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo. Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los CASA, como por ejemplo:

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

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

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

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

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

LIN:  $(VSL/VCL) * 100$

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

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

$$\text{WOB: } (\text{VAP/VCL}) * 100$$

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

Burdworth et al. (1988) observaron una correlación significativa entre el porcentaje de espermatozoides móviles y la velocidad de los espermatozoides, con el índice de fertilidad competitiva. Farrell et al. (1998) reportaron una correlación muy alta entre los parámetros de motilidad combinados medidos por CASA en semen fresco y fertilidad del toro con una buena relación calidad predictiva ( $r^2 = 0,63$  a  $0,98$ ), cuando la fecundidad se ha definido como 59 días de no volver al servicio. De manera parecida, Januskauskas et al (2000) reportaron una correlación significativa entre el porcentaje lineal espermatozoides móviles con 56 días de retención en la tasa de toros lecheros suecos rojo y blanco.

Entre las variables de CASA diferentes, motilidad progresiva por sí solo contribuyó a 62,6% y, junto con la integridad de membrana, contribuyó a 64,1% de la variación en el porcentaje de fertilización. Las mediciones de la velocidad (VAP y VSL) tuvieron un efecto significativo sobre la fertilidad in vitro y contribuyó sólo el 41,2% de la varianza, mientras que ellos contribuyeron al 66,1% de variación junto con la motilidad progresiva y el porcentaje hipoosmótico de espermatozoides reacciono.

Todos estos estudios mostraron que entre las características de movimiento de espermatozoides diferentes evaluados por CASA, la motilidad progresiva y parámetros de velocidad como VCL, VSL y la velocidad del recorrido (VAP) puede ser de utilidad en la predicción de la fertilidad del semen de toros (Kathivaran et al., 2011).



## *SQA-Vb*

El Equipo SQA-Vb, Medical Electronics Systems, (MedLab) mediante un software adecuado (B-Sperm), calcula en forma automática la concentración y vitalidad del semen (Figura 3).



Figura 3. SQA-Vb

El equipo, diseñado por Medical Electronics Systems, fue desarrollado en Israel en 1993, luego en el año 2005 oficialmente se estableció en Viena y en Los Angeles. La SQA-Vb es un dispositivo de alto rendimiento analítico veterinario que combina el estado de la tecnología más avanzada en electro-óptica, microscopía algoritmos informáticos un video. El sistema puede ser usado para realizar pruebas automatizadas o manuales. El SQA realiza un análisis automatizado rápido y confiable de semen de toro para: dosificación, fresco, congelado y QC-EEB aplicaciones y el sistema de visualización de video permite al usuario la flexibilidad de ver las muestras a través de aumentos de 300X y 500X.

Al momento de comenzar a utilizarlo, el usuario simplemente tiene que seleccionar el modo de dosificación desde la pantalla de SQA, ejecutar las pruebas y luego el equipo transfiere los resultados a la computadora donde B-Sperm software proporciona todas las tablas de dosificación, cálculos y análisis.

Presenta un modo, QC-congelado de la SQA que se utiliza para analizar la calidad de semen de toro congelado antes de la inseminación.

Los resultados demoran 70 segundos, de manera totalmente automatizada y los parámetros medidos son:

- Concentración (M/ml)
- Concentración de espermatozoides móviles (M/ml)
- Motilidad (%)
- Motilidad Progresiva (%)
- Concentración de esp. con motilidad progresiva (M/ml)
- Velocidad (micras/seg)
- Total (esperm./eyaculado)
- Total móviles (esperm./eyaculado)
- Total Motilidad Progresiva (esperm./eyaculado)
- Morfología (%)

Para dar inicio al análisis el capilar, en el cual se encuentra la muestra en estudio, se inserta en el bloque óptico. La concentración se mide mediante el análisis de millones de células de espermatozoides en la sección gruesa del capilar de SQA-V: Una muy específica longitud de onda de la luz es absorbida por las células espermáticas.

Un detector mide la cantidad de luz absorbida por las células de espermatozoides y convierte este valor de densidad óptica (OD). "OD" se traduce en la concentración de espermatozoides por un microprocesador y algoritmos patentados MES.

La motilidad se mide mediante el análisis de decenas de miles de células de espermatozoides en la sección delgada de los SQA-Vb capilares: las células móviles pasan a través de un haz de luz creando perturbaciones en el haz de luz. Un detector de motilidad los convierte en luz perturbaciones en señales eléctricas ("picos y valles") y las transmite a un convertidor que las traduce al formato digital. Estas señales electrónicas son analizadas por el SQA software y propiedades de algoritmos y traducido en los parámetros de motilidad de espermatozoides (Figura 4).

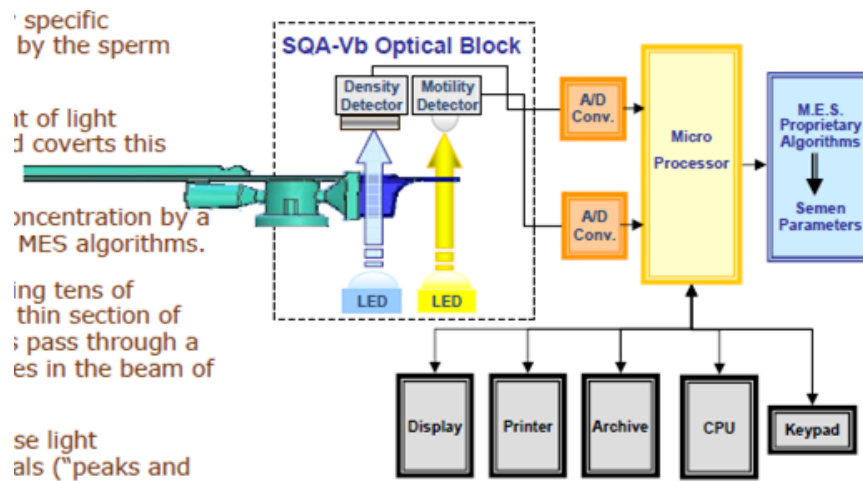


Figura 4. Tecnología de lectura del capilar de SQA-Vb

### *Preparación de la muestra a analizar*

Luego de realizada la correcta colección del material seminal, sea realizada ésta tanto por vagina artificial como por electroeyaculación, se procedió a la preparación de una muestra de semen para su posterior análisis (Figura 5).

Al equipo se le ingresan los datos tanto de identificación del toro, raza, temperatura, volumen de la muestra, número de muestra en el día. Una vez ingresados los datos del reproductor éstos ya quedaron guardados en el equipo. Para preparar la muestra se utiliza un diluyente (QwikCheck), el cual es uno de los componentes del equipo para su correcta utilización, el mismo viene en un dispensador calibrado, del cual se utilizan 2 mL para diluir una muestra de 100 ul de semen previamente medida en una pipeta calibrada. Luego de diluida la muestra, se debe proceder a cargar el capilar para insertarlo en la cámara o bloque óptico (equipo). Los capilares son para 10 usos, siempre y cuando sean correctamente lavados y desinfectados. En 60-70 segundos ya se pudieron observar los datos pertenecientes a ese toro. Para el lavado de los capilares, primero se le hicieron tres lavados en alcohol isopropílico (70%), tres en agua destilada y tres en agua corriente. Luego se dejan secar en un recipiente cerrado con desecantes (perlas azules de gel de sílice) en su interior, por un lapso de tiempo de 12 a 24 horas.

Después de finalizados los análisis en el día, se procede a la limpieza del equipo y se imprimen los parámetros de medición, para comprobar que no perdió su calibración.



Figura 5. Pasos y demostración de componentes del proceso.

### B-Sperm Software

El B-Sperm es un software de gestión de datos que trabaja en conjunto con el SQA-Vb. Los resultados de las pruebas y la información de la dosificación, tanto para semen fresco como para semen congelado y el modo de detección de BSE (Breeding Soundness Evaluation), se pueden descargar desde el SQA-Vb y analizados, clasificados, representar gráficamente y posteriormente ser almacenados en un archivo en la computadora. A su vez, las muestras de semen se pueden ver en tiempo real. Se pueden capturar imágenes de esa muestra y grabar un video clip, que luego se adjuntaran a los registros de las pruebas, almacenándose si se requiere en un archivo de pc de B-Sperm (Figura 6).

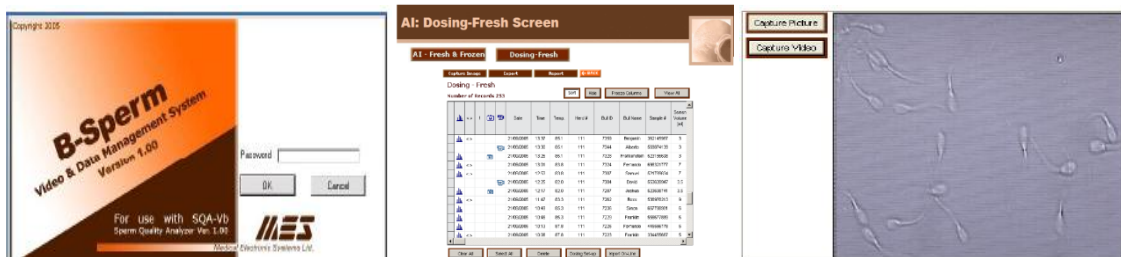


Figura 6. B-Sperm Software y captura de imagen de material seminal.

### *Determinación de células vivas y muertas*

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

Con un segundo portaobjeto tocar ambos extremos de la preparación, y en un tercer portaobjeto realizar frotis. Secar al aire y observar a mayor aumento. Interpretación: las células coloreadas con eosina (rosadas) tienen alteradas la permeabilidad de su membrana plasmática, se consideran a estas células muertas; mientras que las sin coloración son consideradas células vivas.

#### *Determinación de anormalidades espermáticas*

Las anormalidades espermáticas en el semen de toro, representa uno de los más importantes efectos sobre la fertilidad, la morfología de los espermatozoides refleja la salud de los túbulos seminíferos y, hasta cierto punto, la del epidídimo. Una comprensión de la importancia de los tipos específicos de anormalidades en el espermatozoide y los números en que éstos se detectan, le permiten al operario o diagnosticador hacer un pronóstico de fertilidad y puede indicar un curso de tratamiento para recuperar a un toro con producción de espermatozoides anormales. El espermatozoide eyaculado se libera de los túbulos seminíferos hasta dos semanas antes, además el proceso de formación de espermatozoides se lleva a cabo durante un periodo que entorna los 60 días antes de la espermiación, por lo tanto las anomalías encontradas podrían reflejar alteraciones en la función testicular que ocurrieron hace algún tiempo ya (Freneau et al., 2010).

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

Generalmente se acepta que el semen del toro clasificado como satisfactorio debería contener al menos 70% de espermatozoides morfológicamente normales, con no más del 20% de espermatozoides con un anormal de la cabeza (Menon et al., 2011). Anormalidades en el espermatozoide tradicionalmente han sido clasificadas por ubicación del defecto (cabeza, pieza intermedia, cola), o su lugar de origen (primario: testículo; Secundaria: epidídimo; terciario: accesorio glándulas / post-eyaculación). Bloom clasificó las anormalidades en el espermatozoide según su efecto sobre fertilidad.

Los defectos principales incluyen la mayoría de las anomalías de la cabeza y pieza intermedia, gotas citoplasmáticas proximales y anomalías individuales presentes en un alto porcentaje, mientras que los defectos de menor importancia incluyen bucle colas, cabezas separadas o sueltas y gotas citoplasmáticas distales (Menon et al., 2010).

A medida que la cabeza del espermatozoide contiene el material genético y efecto clave de la fertilización, la mayoría de las anomalías de cabeza están asociados con un deterioro significativo de la fertilidad. La condensación anormal de la cromatina y formas anormales del núcleo están estrechamente relacionados con la fertilidad reducida. Una anomalía de cabeza como por ej. cabeza piriforme afecta tanto la tasa de fertilización y posterior desarrollo embrionario, con el fracaso de escisión siendo el resultado primario. Defectos acrosomales también están asociados con disminución de la fertilidad (Menon et al., 2010).

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

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

Otra anomalía acrosómica es la membrana acrosomal aplanada. Se ha observado que eyaculados con alta incidencia de esta anomalía podía unirse normalmente a la zona pelúcida del ovocito, y su matriz acrosomal permanecía funcional (Meyer y Barth, 2001). Las anomalías que afectan al núcleo espermático, como las vacuolas nucleares, suelen tener una menor incidencia. Thundathil en 1998, demostraron que los espermatozoide que presentaban este defecto nuclear se unían con dificultad a la zona pelúcida, pero eran capaces de penetrar el citoplasma del ovocito y fertilizarlo, y el embrión formado continuaba su desarrollo hasta la fase del blastocisto.

Las anomalías de la pieza intermedia y de la cola generalmente surgen como defectos de la espermatogénesis y espermatozoides con tales anomalías son o no son móviles o tienen anormal motilidad. Por consiguiente, la presencia de tales anomalías es generalmente se asocia con subfertilidad. Una gota proximal citoplasmática se considera un defecto de la espermatogénesis y un alto porcentaje de espermatozoides afectados con gotitas proximales citoplasmáticas tienen resultado o se reflejan en los problemas de fertilidad (Menon et al., 2010).

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

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

Los toros que están atravesando la pubertad tienen grandes cantidades de diferentes anormalidades espermáticas, incluyendo gotas proximales. Es interesante destacar que en toros maduros una alteración en espermatogénesis frecuentemente resulta en un espermiograma similar, es decir, grandes cantidades de anormalidades diferentes incluyendo gotas proximales. Entonces, espermatogénesis anormales en toros púberes pueden tener una base algo similar a la de toros maduros con espermatogénesis alteradas.

Se dice que encontrar gotas proximales en el semen de toros jóvenes es “un signo de inmadurez”. Algunos han malinterpretado esto como que las células espermáticas son inmaduras y no que el toro es inmaduro. Cuando el semen de toros jóvenes se analiza en evaluaciones de aptitud reproductiva es tentador, a veces, clasificar a un toro con grandes cantidades de anormalidades espermáticas y gotas proximales como un reproductor potencialmente satisfactorio con la esperanza de que éste vaya a producir semen normal cuando sea utilizado en el servicio (Barth, 1999).

Quirino et al., (2004) describieron que toros de mayor libido presentan bajo porcentaje de anomalías espermáticas, dado que las características morfológicas tuvieron correlación genética favorable con la libido (Silva et al., 2012).

Las estimaciones de heredabilidad reportadas para los defectos espermáticos también oscilaron de baja a moderada magnitud. Previamente Smith et al. (1989) ya habían relatado una similar magnitud de heredabilidad, de 0,31, para defectos espermáticos primarios, pero casi nula para los secundarios, de 0,02. En un estudio posterior, Kealey et al. (2006) encontraron heredabilidad de 0,30 y 0,33 para defectos espermáticos primarios y secundarios, respectivamente. Recientemente, Garmyn et al. (2011) reportaron estimaciones de heredabilidad de 0,23, 0,27 y 0,25 para defectos espermáticos primarios, secundarios y totales en machos de la raza Angus. Tales magnitudes de las heredabilidades permitirían, al principio, la adopción del porcentual de defectos espermáticos como criterio de selección para mejoría del perfil seminal y de la fertilidad de toros en rebaños comerciales, estableciéndose un progreso genético más efectivo que para las demás características seminales. Sin embargo, otros autores no corroboran tal suposición, dado que estos encontraron bajas magnitudes de heredabilidad para los defectos espermáticos (Dias et al., 2006, Silva 2009, Silva et al., 2012).

Hay dos tipos de preparaciones que son las más comúnmente utilizadas para poder realizar el análisis morfológico del material seminal, a modo de poder saber con qué porcentaje de anomalías cuenta ese semen y qué tipo de anomalía predomina.

1) Preparaciones secas.

1.1. Técnicas de contraste con Tinta China.

1.2. Técnicas de coloración de Williams.

Ambas técnicas están descritas pero se consideran obsoletas.

2) Preparaciones húmedas.

2.1. Técnica del formol salino buffereado.

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



Interpretación: la técnica se basa en el hecho que los espermatozoides son altamente transparentes a la luz; sin embargo causan cambios de fase que resultan de pequeñas diferencias en el índice de refracción y del grosor de las diferentes partes, se vuelven más claramente detectables por este método. Esta técnica permite observar estructuras tales como el acrosoma, las membranas, etc.

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

Cuadro 5: Valores fisiológicos de anomalías en el toro.

<b>Cabezas</b>	3-18%
<b>Piezas medias</b>	0-2%
<b>Colas</b>	0-7%
<b>Gota proximal</b>	0-5%
<b>Totales</b>	<b>15-20%</b>

(Repartido Teriogenología 2008).

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

Freneau et al., (2010) compararon los dos métodos de análisis para morfología, con preparaciones secas (eosina-nigrosina) y preparaciones húmedas con solución salina isotónica (SSI).

La media del porcentaje de espermatozoides normales no hizo que difieran entre métodos ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, la preparación húmeda detecta defectos en los espermatozoides más grandes, mientras que E-N detecta defectos espermáticos más pequeños (ambos  $P < 0,05$ ). La detección de los principales defectos fue 7,2 puntos porcentuales mayor para las muestras evaluadas por SSI vs E-N. En contraste, el número de menores defectos detectados por E-N fue 5,8 puntos porcentuales mayor que en las muestras evaluadas por la SSI. Esto podría ser importante cuando este sistema de clasificación (es decir, los espermatozoides mayor o menor defectos) se utiliza como la base para el pronóstico (Freneau et al., 2010).

El número total de espermatozoides con gotas citoplasmáticas (proximal o distal) detectado con SSI fue casi el doble que detecta con E-N ( $P < 0,05$ ). Un patrón similar producido por las gotas tanto distal y proximal cuando se examinaron individualmente. Gota proximal también se detectó en muestras de toro más utilizando SSI (71 comparado a 58). Dos efectos distintos, o sus combinados, pueden producir esta diferencia. Uno podría ser los efectos mecánicos y / o químicos durante el frótis y la tinción del proceso que causa gotitas a que se pueden desintegrar o quedar derramadas (Sekoni et al., 1981). Otra posibilidad podría ser que el proceso provoque una distribución irregular de las gotas sobre la corredera debido a la hidrodinámica de irregulares partículas de tamaño en los fluidos (Halliday et al., 1993).

Números elevados de gotas pueden afectar negativamente a la fertilidad del toro (Soderquist et al., 1991). Toros con más de 30% de gotas proximales tenían severamente deprimida la fertilidad in vitro (Mortimer, 1991). Gotas citoplasmáticas proximales pueden considerarse como defectos incompensables en los espermatozoides (Amann et al., 2000) que son capaces de ir causando la pérdida de la preñez temprana (Saacke et al., 2000; Freneau et al., 2010).

### *Concentración espermática*

La concentración de semen se puede calcular por conteo en cámara cuenta glóbulos, realizando una dilución del semen de 1:100, o mediante el empleo de espectrofotómetro, previamente calibrado (Cavestany, 1994).

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

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

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

Contaje en cámara cuenta glóbulos con retículo de Thomas-Zeiss.

Método: Cargar una pipeta Potin hasta la graduación 0,5 con materiales seminales y enrasar con soluciones de cloruro de sodio al 3%. Mezclar (agitando la pipeta 50 veces, sostenida en ambos extremos). Descartar las 2 primeras gotas sobre un papel de filtro, y secarla en su extremo inferior. Colocar un cubre objeto sobre los retículos y cargar la cámara tocando con un extremo de la pipeta ambos bordes del cubre objetos en el lugar donde se contacta con los retículos (1 de cada lado). Contar las cabezas de los espermatozoides que se encuentran en 5 cuadrados mayores (leídos en diagonal preferentemente).

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

b)  $C = N \times 5.000$  (dilución 1/100)

Valores fisiológicos para el toro:  $1.2 - 1.5 \times 10^9$  spz/mL (Cavestany 1994)

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

El examen bacteriológico y virológico de semen puede estar indicado en ciertas circunstancias, especialmente cuando hay signos de inflamación o infección genital en hembras luego del apareamiento con un macho, cuando hay una rápida declinación de la motilidad de los espermatozoides a raíz del almacenamiento, o se produce aumento del pH o la presencia de leucocitos o directamente pus en el eyaculado, o en el frotis de semen.

Los microorganismos o cierto agente viral que pueden llegar a aparecer en el semen pueden ser procedentes de los testículos o los epidídimos, de las glándulas accesorias, los conductos deferentes, la uretra, el prepucio o el pene. El examen de semen de los toros por métodos de cultivo o por inoculación de semen a animales de prueba puede revelar que estamos ante un animal infectado con brucelosis, tricomoniasis y vibriosis.

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

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

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

Roberts (1979), afirma que la congelación del semen para la conservación de los espermatozoides preservará también a la mayoría de los agentes infecciosos, incluso los virus. El nitrógeno líquido utilizado para el almacenaje de semen congelado puede llegar también a contaminarse con diversos microorganismos y virus, y ser así una fuente de infección para la vaca (Roberts, 1979). Al recoger muestras de semen para estudios bacteriológicos o virales es esencial observar prácticas sanitarias e higiénicas estrictas. Aunque el semen se recoge en una vagina esterilizada, muchas veces se da cierta contaminación. Es imposible obtener una muestra de semen bacteriológicamente estéril en la vagina artificial o por electroeyaculación, debido a la contaminación por contacto con la uretra, el prepucio y el aire (Roberts, 1979).

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

## **El Semen y sus diferencias entre razas**

### *Volumen*

En la raza Simmental, Kapš et al., (2000) y Gredler et al., (2007) reportaron heredabilidad para volumen seminal de baja y moderada magnitud, 0,04 y 0,18, respectivamente. Ducrocq y Humblot (1995) y Mathevon et al (1998), en razas francesas, estimaron valores elevados de heredabilidad para la misma característica, 0,49 y 0,65, respectivamente. Estos autores resaltaron la importancia de la inclusión del volumen seminal y concentración espermática en análisis genético debido a la variación entre eyaculados de un mismo toro. En este caso, la definición del método de colecta del semen es un factor importante, pues se espera un aumento del volumen y una disminución de la concentración espermática utilizando el método de electroeyaculación cuando es comparado con el método de vagina artificial (Silva et al.,2012).

### *Motilidad*

Hoflack et al. (2007) compararon las características de motilidad espermática para toros de razas lecheras como Holstein-Friesian y toros carniceros como el Belgian Blue bajo el ajuste de parámetro similar al CASA. Se pudo observar diferencias sustanciales para los parámetros de motilidad a favor de los toros de raza lechera, a su vez el análisis de las subpoblaciones espermáticas revelo tener espermatozoides menos rápidos y más lentos y estáticos para los alh Belgian Blue en comparación con los Holstein.

Los porcentajes del total y progresivamente espermatozoides móviles y los parámetros de motilidad de espermatozoides (VAP, VSL y STR) fueron significativamente menores en la raza Belgian Blue. Por otra parte, una menor eficiencia cinética de Bovino Blanco Azul Belga se observó en términos de menor y mayor BCF y ALH. Un patrón similar de características de movimiento (motilidad progresiva menor, VSL, BCF y ALH superior) se observó en el caso de Jersey (Bos Taurus) y Kangayam (Bos Indicus). En cuanto a las características de movimiento después de la descongelación de espermatozoides, la motilidad progresiva y la velocidad fueron mayores en los toros Holstein (Hallap et al., 2006) que la de raza Jersey. Sin embargo, la mayoría de los parámetros fueron más bajos en bovinos cruzados (B.taurus x B.indicus) y el ganado Kangayam (B.indicus) excepto ALH, BCF y STR (Kathivaran et al. 2005; Kathivaran et al. 2011).

### *Morfología*

En cuanto a las diferencias de morfología espermática entre razas, para un estudio realizado por Menon et al., (2011), el porcentaje promedio de defectos de cola fueron mayores ( $P=0,01$ ) en toros Angus y Hereford en comparación con otras razas. En general, los defectos de pieza intermedia (12,80% a 13,19%) fueron mayores ( $P<0,01$ ) que los de cabeza (5,47% a 6,13%) y defectos de cola (1,53% a 2,14%). Los defectos de cabeza detectados entre varias razas incluidas fueron cabezas separadas, defectos en el tamaño y la forma de la cabeza, vacuolas nucleares, defectos de acrosoma y otros (como fosa implantación extra y doble cabeza). Los de pieza intermedia como reflejo de pieza intermedia distal, gotitas proximales, y otros, tales como, pseudogotas como defecto, el apego abaxial de la cola, pieza intermedia doble, y aplasia segmental, fueron los mayormente encontrados.

De 1.642 toros sometidos a evaluación de la morfología espermática, 1363 (83,0%) fueron clasificados como satisfactorios y el restante 279 (17,0%) como insatisfactorios reproductores potenciales. El más alto porcentaje de reproductores potenciales satisfactorios era de Limousin (90,6%) y el más bajo de los toros Hereford (78,8%) (Menon et al., 2011).

A pesar de que los defectos de la pieza intermedia fueron ligeramente mayor en comparación con toros mayores de 1,5, se encontró asociación significativa entre la edad y las anomalías espermáticas (Menon et al., 2011).

Rege et al., (2000) observaron que el porcentaje de anormalidades espermáticas fue negativamente correlacionado con la motilidad y turbidez, además del volumen del semen y concentración espermática, tanto por asociación fenotípica como genética. Silva (2009) encontró correlaciones genéticas favorables entre PE (Perímetro Escrotal) con defectos espermáticos menores ( $-0,23$ ), defectos espermáticos mayores ( $-0,16$ ) y defectos espermáticos totales ( $-0,25$ ), lo que sugiere, aunque las magnitudes no sean altas, que la selección para PE favorecería la disminución de incidencias de patologías espermáticas (Silva et al., 2012).

## **HIPÓTESIS**

Existe una alta correlación entre la valoración de semen por métodos manuales y computarizados.

## **OBJETIVOS**

Comparar los parámetros de concentración y motilidad seminal logrados por métodos tradicionales (concentración por contaje directo y motilidad por apreciación visual) con los obtenidos por un equipo automático.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio del presente trabajo fue realizado en el Centro de Toros de GENSUR ubicado en el departamento de San José, a 2km por camino vecinal al oeste del km 85 de la ruta 1, y en el Departamento de Reproducción de la Facultad de Veterinaria.

### **Animales y Manejo**

El ensayo se realizó durante los meses de marzo y abril de 2009 y se evaluaron 116 eyaculados de 18 toros de 5 razas (2 de leche, Holando y Jersey y 3 de carne, Polled Hereford, Aberdeen Angus y Red Angus).

El semen se colectó mediante vagina artificial en la mayoría de los casos, a excepción de un toro de la raza Jersey que se empleó el método de electroeyaculación ya que éste presentaba Artrosis en un miembro posterior, problema que le dificultaba el salto normal. La colecta seminal se realizaba en horas de la mañana.

En GENSUR se trabajó con los eyaculados obtenidos en los días de trabajo del centro. Una vez obtenido el eyaculado, el mismo fue evaluado por el personal de GENSUR de la manera que lo hace habitualmente. Una muestra de cada eyaculado fue apartada para realizar los estudios de concentración y motilidad mediante un equipo computarizado (Equipo SQA-Bv, Medical Electronics Systems) y otra para el estudio morfológico (técnica de formol salino bufferado en microscopio de contraste de fase a 100x). Cada método de evaluación se realizó de forma independiente, de manera que no existiera influencia de los mismos. El análisis del estudio morfológico se realizó en el Laboratorio del Departamento de Reproducción de la Facultad de Veterinaria.

### **Equipo**

Para el análisis computarizado se utilizó el Equipo SQA-Bv, Medical Electronics Systems, cedido por MedLab el cual mediante un software adecuado (B-Sperm), calcula en forma automática la concentración y vitalidad del semen.

### **Estudio Morfológico**

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

Para el análisis manual de la morfología espermática se utilizó la Técnica del formol salino bufferado. Como metodología se colocó en un tubo de ensayo con tapa 1 cc aproximadamente de solución de formol salino bufferado (+) y una gota de semen, ambas a igual temperatura. Previo al análisis se mezcló bien los componentes y se procedió a colocar una gota entre porta y cubreobjetos y observar en contraste de fase de 400 X y 1000 X contando un total de 200 células registrando las anomalías por su tipo.

Los defectos de los espermatozoides se agruparon de la siguiente manera: los defectos de la cabeza (cabeza suelta, defectos de tamaño y forma, vacuolas nucleares, defectos de acrosoma, y otros); los defectos de la pieza intermedia (gota proximal, gota distal, pieza intermedia doblada, pieza intermedia enrollada y otros), y los defectos de cola (cola doblada, cola enrollada, cola corta).

### **Análisis Estadístico**

Los datos se analizaron por la prueba de t (Student) y se realizó correlación lineal de Pearson (Proc Corr, SAS). El nivel de significancia empleado para el análisis de datos fue de  $P < 0,0001$  a excepción de la morfología que fue  $P < 0,09$ .

## RESULTADOS

### Comparación entre el equipo SQA y la evaluación manual de semen de toro

En el Cuadro 6 se presentan los análisis comparativos entre los dos métodos en estudio para calidad de semen. Estos son el equipo SQA y el método manual, para las características de concentración de espermatozoides medida en millones/ml, motilidad en % y total de espermatozoides por eyaculado en millones/ml.

Cuadro 6. Características de los eyaculados de acuerdo al sistema de evaluación

Evaluación	Concentración <sup>1</sup>	Motilidad (%)	Total esp/eyaculado <sup>2</sup>
Equipo SQA	823,1 ± 44,0	67,4 ± 1,5	4035,0 ± 265,0
Manual	856,7 ± 42,0	68,8 ± 1,5	4223,0 ± 264,9

<sup>1</sup>: millones/ml; <sup>2</sup>: millones totales

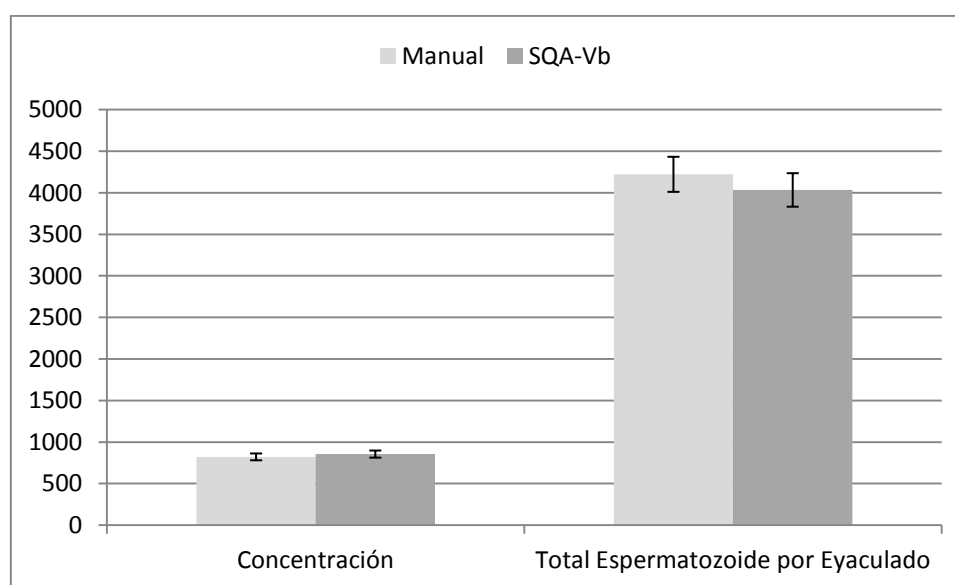


Figura 7. Comparación del análisis de concentración y espermatozoides totales entre SQA y método manual.

Como muestra la Figura 7 no se ven diferencias en la comparación de métodos para la concentración y los espermatozoides totales evaluados por los dos métodos.

En la Figura 8 se puede ver el análisis comparativo para la motilidad espermática la cual fue de 67,4% para la medida en SQA-Vb y de 68,8% para el análisis realizado por el método manual, el cual como fue explicado anteriormente no deja de ser un método de estudio subjetivo.

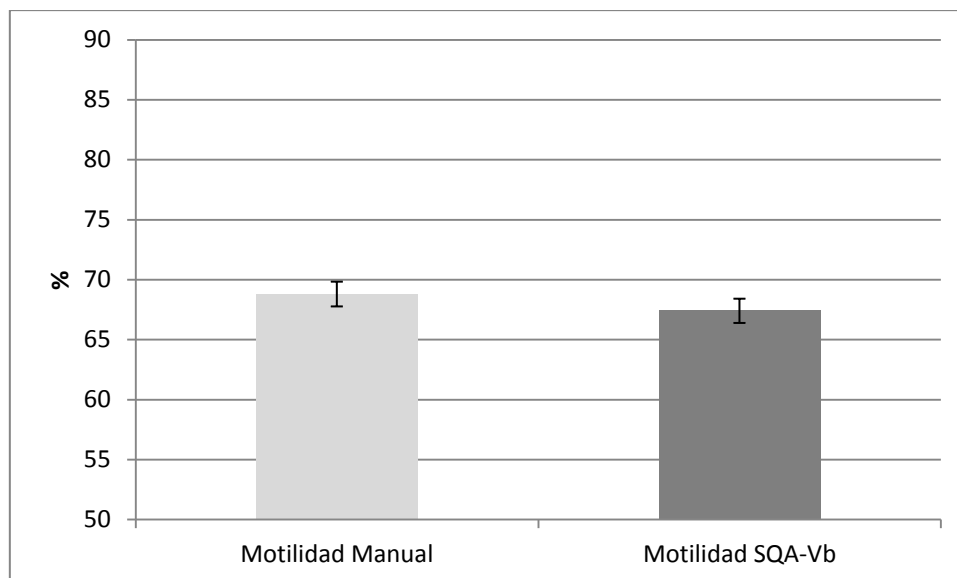


Figura 8. Comparación del análisis de motilidad entre los dos métodos en estudio.

En el Cuadro 7 se muestra la correlación estadística entre ambos métodos. Si bien se ven diferencias numéricas, para la concentración de 0,866, para la motilidad de 0,420 y para el total de espermatozoides por eyaculado de 0,928, estadísticamente no hay diferencias significativas entre las características seminales en estudio, la cual tuvo una significancia de  $P < 0.0001$ , tanto para la concentración (millones/ml), Motilidad (%) y para el total de espermatozoides por eyaculado (millones/ml).

Cuadro 7. Correlación entre concentración espermática, motilidad y total de espermatozoides por eyaculado determinada por métodos manuales o computarizados

	Concentración <sup>1</sup>	Motilidad (%)	Total esp/eyaculado <sup>1</sup>
r	0,866	0,420	0,928
n	116	116	116
p	0,0001	0,0001	0,0001

<sup>1</sup>: millones por mL

En el cuadro 3 se muestra el análisis comparativo para la morfología espermática sobre un total de 93 muestras analizadas para ambos casos y la correlación estadística para la variable en estudio. Tal como se observa en el cuadro 3 y en la Figura 7 hay diferencias para la media de espermatozoides normales expresados en % entre ambos métodos, no hay diferencias significativas para ambas variables  $P < 0,09$  con una correlación  $r = 0,17753$ .

Cuadro 8. Evaluación Morfológica

Evaluación y Método	N	Media (%)
Morfología Manual	93	84,9 ± 1,2
Morfología SQA-Vb	93	84,8 ± 0,8
Correlación		$r = 0,17753$
Significancia		$P < 0,09$

En la Figura 9 se puede observar el porcentaje de espermatozoides normales para ambos métodos en base a lo explicado anteriormente.

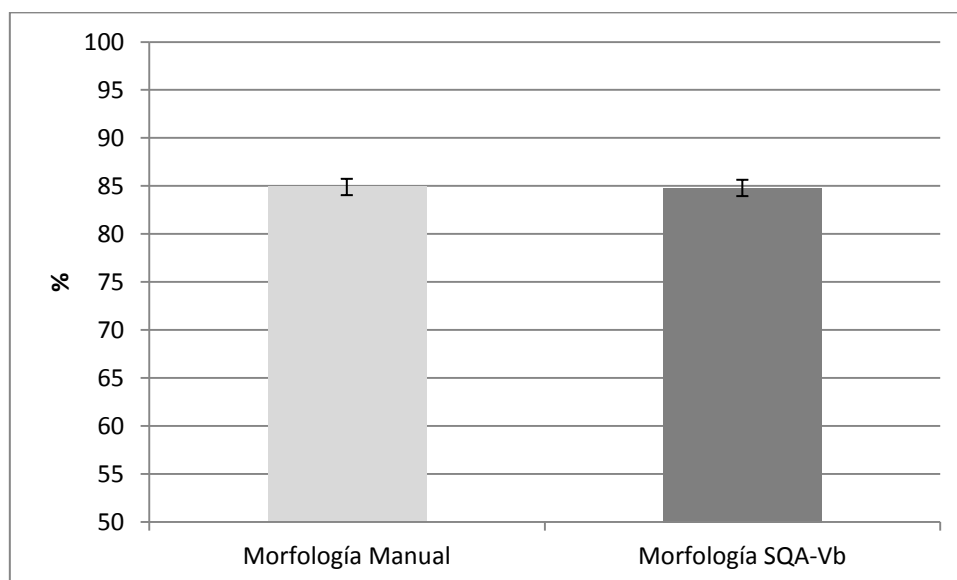


Figura 9. Morfología comparativa expresada en % de espermatozoides normales.

## DISCUSIÓN

Langerlof en 1934 fue el primero en analizar en detalle la correlación entre la morfología espermática y su fertilidad. Establece por otro lado que la correlación se mantiene si el porcentaje de espermatozoides anormales se encuentra dentro de los límites fisiológicos (Haedo, 1986).

Menon et al. (2011) clasifica un toro como satisfactorio, a aquel que contiene al menos un 70% de espermatozoides morfológicamente normales y que no tienen más de un 20% de anormalidades de cabeza. Observando los resultados obtenidos en el presente estudio la media de espermatazoides normales superó claramente el 70% mencionado por Menon, en ambos métodos en estudio, con un 84,85161% para el método manual y de un 84,80645% para el obtenido por SQA-Vb.

No se sabe con certeza el porcentaje máximo de anormalidades espermáticas que puede ser compatible con una fertilidad normal, lo que sí está demostrado es que existe una correlación negativa entre el número de formas anómalas y la fertilidad del toro (Barth y Oko, 1989; Januskauskas y Zilinskas, 2002).

Como describen los resultados anteriormente, no se encontraron diferencias significativas para la variable % de espermatozoides normales entre ambos métodos en estudio, pero sí diferencias numéricas en mayor número para el método manual. Lo que concuerda con Freneau et al. (2010), en el que obtuvieron diferencias mayores al comparar una preparación húmeda con Eosina Nigrosina para morfología. Se explica porque la preparación húmeda detecta defectos más grandes. Al momento que se realizó el análisis morfológico manual, las anormalidades encontradas fueron agrupadas por defecto; cabeza, pieza intermedia y cola. En la agrupación de anormalidades se observaron mayores anormalidades como gotas citoplasmáticas, lo cual se puede deber tal como lo mencionó Freneau et al. (2010) a que el proceso de la preparación de la muestra podría tener un efecto mecánico y/o químico durante la preparación de frótis que lleve a una distribución irregular de las gotas sobre el portaobjetos debido a la hidrodinámica de partículas de tamaño irregulares en los fluidos (Halliday et al., 1993).

La media obtenida para la motilidad fue de 67,4% para SQA-Vb y de 68,8% para el método manual, valores que están entre los detallados por Bloom que señala que los toros más fértiles son aquellos que cuentan con un 50-80% de espermatozoides con activa motilidad progresiva. Awad (2011), concluyó que la media de la motilidad espermática en semen fresco fue de 82,3%, valores que se encuentran por encima de los establecidos en este caso.

Estadísticamente no se obtuvieron diferencias significativas entre los métodos en estudio para la motilidad, con una correlación de 0,420 y una significancia de  $P < 0.0001$ . Farrell et al. (1998) reportaron una correlación muy alta entre los parámetros de motilidad combinados medidos por CASA en semen fresco y fertilidad del toro con una buena relación calidad predictiva ( $r^2 = 0,63$  a  $0,98$ ), cuando la fecundidad se ha definido como 59 días de no volver al servicio. De manera parecida, Januskauskas et al (2000) reportaron una correlación significativa entre el porcentaje lineal de espermatozoides móviles con 56 días de retención en la tasa de toros lecheros suecos rojo y blanco.

Hay que tener en cuenta que el análisis manual de la motilidad no deja de ser un método subjetivo, que debido a la subjetividad de la técnica puede ser un mal predictor de la fertilidad (Kathivaran et al., 2011).

Para la concentración los valores obtenidos se encuentran dentro de los valores fisiológicos normales del toro  $1.2 - 1.5 \times 10^9$ , si bien existen diferencias numéricas entre los dos métodos analizados, la correlación fue de 0,866, no existiendo diferencias estadísticamente significativas. Similar a lo ocurrido con el total de espermatozoides por eyaculado.

Es a destacar que no se obtuvo un método similar en estudio a realizar un análisis comparativo más profundo en condiciones similares, ni tampoco otro estudio de los mismos métodos comparados: manual y SQA-Vb. Sería bueno poderlo comparar con CASA bajo las mismas condiciones.

## **CONCLUSIONES**

Se puede concluir que al haber obtenido un % de motilidad espermática, concentración y espermatozoides totales por eyaculado similares entre las variables en estudio, el equipo SQA-Vb puede ser un buen predictor de la fertilidad de toros. No es un método subjetivo, con las contraindicaciones y factor personal de entrenamiento que requiere, es un método computarizado en el cual de manera automatizada en 70 segundos se puede tener la muestra analizada.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña CM, de Dominicis OH, Narbaitz M, de Apellániz A, Cabodevila J, Callejas S, Cisale H. (2001) Evaluación de toros en rodeos de cría: ¿Es Necesario el Exámen de Semen? Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este. Disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar) Fecha de Consulta: 19/01/2013.
2. Allard AH. (1947) Determination of the density of lipid and solids, application to the determination of density of bull semen and of Brandie's solution. Unpublished results. Laboratory of Animal Breeding and Artificial Insemination. Cornell University.
3. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H. (1991) Reproducción y Obstetricia en Veterinaria (Teriogenología). Madrid, McGraw-Hill-Interamericana 702 p.
4. Awad, MM. (2011) Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 123 157-162.
5. Baker FN, Cragle RG, Salisbury GW, Van Dework NL. (1957) Spermatozoa velocities in vitro. *Fertil. Steril.* 8:149-155.
6. Barth A. (1999). Factores que afectan la pubertad de los toros. *Taurus* 1(3):4-17. Disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar) Fecha de Consulta: 19/01/2013.
7. Barth AD, Oko RJ. (1989) Abnormal Morphology of bovine Spermatozoa. Iowa State University Press.
8. Bloom W, Fawcett W. (1968). Tratado de Histología. 9°ed. Labor, 1042p.
9. Bloom W, Fawcett W. (1995). Tratado de Histología. 12°ed. Mac Graw Hill, 1044p.
10. Boixo JC. (1996) Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad *inform.Vet.*, pp:33-37.
11. Bonadonna T. (1986) Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Buenos Aires, Tomo I. Hemisferio Sur., 286 p.
12. Bonadonna T. (1989) Reproducción animal e I.A.; Tomo II, Buenos Aires. Hemisferio Sur. 1028p.
13. Burdworth PR, Amann RP, Chapman PL. (1988) Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 9:41-54.
14. Catena M, Cabodevilla V. (1999) Evaluación del semen bovino congelado. *Taurus*, (13), 13-31.
15. Cavestany D. (1986) Algunos Aspectos de la Fisiología Reproductiva del Toro 112:1-29, tema II, IICA-MAGP, Aptitud Reproductiva del Toro, Montevideo. Publicaciones Misceláneas.
16. Cavestany D. (1994) Procesamiento y Congelación de Semen de Toro, Montevideo, Santa Catalina, 23 p.
17. Cuenca L, Chiossoni M, Ferraris A, Haedo F, Rivero R. (1986) Evaluación de la Capacidad Reproductiva del Toro 112:73-112, tema II, IICA-MAGP, Aptitud Reproductiva del Toro, Montevideo. Publicaciones Misceláneas.
18. Davis RO, Katz DF. (1993) Operational Standards for CASA Instruments. *J Androl* 14, 385-394. Disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar) Fecha de Consulta: 21/01/2013.
19. Días JC, Andrade VJ, Fridrich AB, Salvador DF, Vale Filho VR, Corrêa AB, Silva MA. (2006) Estimativas de parámetros genéticos de características reproductivas de touros Nelore, de dois e três anos de idade. *Arq Bras Med Vet Zootec* 58, 388-393.

20. Dott HM, Foster GC. (1971) The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *J Reprod Fertil* 55, 161-166.
21. Ducrocq V, Humblot P. (1995) Genetic characteristics and evolution of semen production of young Normande bulls. *Livest Prod Sci* 41, 1-10.
22. Farrell PB, Presicco GA, Brackett CC, Foote RH. (1998) Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to Fertility. *Theriogenology* 49, 871-879.
23. Fitzpatrick, L.A. Fordyce, G., McGowan, M.R., Bertram, J.D., Doogan, V.J., De Faveri, J., Miller, R.G., Jayawardhana, G.A., Holroyd, R.G. (2002). Bull selection and use in northern Australia 2. Semen traits. *Anim. Reprod. Sci.*, pp. 39-49.
24. Freneau GE, Chenoweth PJ, Ellis R, Rupp G. (2010) Sperm Morphology of Beef Bulls Evaluated by Two Different Methods, *Animal Reproduction Science* 118:176-181.
25. Freund M. (1966) Standards for the rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int J Fertil* 11:97-180.
26. Garmyn AJ, Moser DW, Christmas RA and Minick J. (2011) Estimation of genetic parameters and effects of cytoplasmic line on scrotal circumference and semen quality traits in Angus bulls. *J Anim Sci* 89:693-698.
27. Gómez M, Migliorisi A. Protocolo para la Evaluación de Semen en Rumiantes. Cátedra de Reproducción Animal. Facultad de Cs. Veterinarias-UNLP. Disponible en [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar) Fecha de Consulta: 19/01/2013.
28. Gravance CG, Davis RO. (1995) Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbits. *J Androl* 16, 88-93.
29. Gredler B, Fuerst C, Fuerst-Waltl B, Schwarzenbacher H, Sölkner J. (2007) Genetic parameters for semen production traits in Austrian dual-purpose Simmental bulls. *Reprod Domest Anim* 42, 326-328.
30. Haedo F. (1986) Calidad Seminal 112:103-112, tema II, IICA-MAGP, Aptitud Reproductiva del Toro, Montevideo. Publicaciones Misceláneas.
31. Hafez E. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial*. 7ª ed. México. Mc. Graw-Hill, 519 p.
32. Halliday D, Robert R, Jear W. (1993) Chapter 16: Fluids. En: *Fundamentals of physics*. Willey & son inc. New York. Pp.1306.
33. Hoflack G, Opsomer G, Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, Duchateau L. (2007) Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian bulls. *Reprod Dom Anim* 42:153-161.
34. Holroyd RG, Doogan VJ, De Faveri J, Fordyce G, McGowan MR, Bertram JD, Vankan DM, Fitzpatrick LA, Jawawarhana, Miller RG. (2002) Bull selection and use in northern Australia: 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds, *Animal Reproduction Science*, Volume 71, Issue 1 , Pages 67-79.
35. Holt WV, Palomo MJ. (1996) Optimization of a continuous real time computerized semen analysis for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. *Reprod Fertil Dev* 8, 219-230.
36. Holt WV, Van Look JW. (2004) Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*, 127, 527-535.
37. Howard, T.H., Pace, M.M., 1998. Seminal evaluation and artificial insemination: Fertility and Infertility in Veterinary Practice. Eds: Laing, J.A., Morgan, W.J., Wagner, W.C., Bailliere Tindall. London. U.K., 39-51.

38. Howe GR. (1973) Efforts to relate spermatozoa motility to fertilizing capacity. *Int. J. Fert.*, 3:188-190.
39. Januskauskas A, Gil J, Soderquist L, Haard MG, Haard MC, Johannson A, Rodriguez-Martinez H. (1999) Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52, 641-658.
40. Januskauskas A, Johannisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H, (2000). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy IA Bulls. *Theriogenology* 53, 859-875.
41. Januskauskas A, Söderquist L, Håård MG, Håård MCh, Lundeheim N, Rodríguez-Martínez, H. (1996) Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of Swedish Red and White A.I. bulls. *Acta vet. scand.*, 37: 461-470.
42. Januskauskas A, Zilinskas H. (2002) Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika*. 17 (39).
43. Kaps M, posavi M, Stipic N, Mikulic B. (2000) Genetic evaluation of semen and growth traits of young Simmental bulls in performance tests. *Agric Conspec Sci* 65:15-20.
44. Kathivaran P, Kalatharan J, Edwin M, Veerapandian C. (2005). Post-Thaw sperm motion characteristics of different crossbred bull spermatozoa assessed by computer assisted semen analyzer. *J Remount Vet Corps* 44, 33-38.
45. Kathivaran P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. (2011) Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System-A Review, *Reproduction in Domestic Animals* 46, 165-172.
46. Kealey CG, MacNeil MD, Tess MW. (2006) Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of Line 1 Hereford bulls. *J. Anim. Sci.* 84, 283-290.
47. Lagerlot N. (1934) Semen morphology. *Acta Pathol Microbiol Scand* 19:254 pp.
48. Liu, L., Banks, S.M., Barnes, K.M. *et al.* (1988) Two-year comparison of testicular responses to pulsatile gonadotropin-releasing hormone and exogenous gonadotropins from the inception of therapy in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67,1140–1145.
49. Makler A. (1978) A new multiple exposure photography method for objective human spermatozoa motility determination. *Fertil Steril* 30:192-199.
50. Mathevon M, Dekkers JCM, Buhr MM. (1998) Environmental management and genetic factors affecting semen production in French Mantbéliard bulls. *Livest Prod Sci* 55, 65-77.
51. Menon AJ, Barkema HW, Wilde R, Kastelic JP, Thundathil JC (2011), Association Between Sperm Abnormalities, Breed, Age, and Scrotal Circumference in Beef Bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research*; 75:241-247.
52. Meyer RD, Barth AD. (2001) Effect of acrosomal defects on fertility of bull used in artificial insemination and natural breeding. *Can. Vet. J.*, 42 (8), 630-4.
53. Mortimer ST. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* 3, 403-439.
54. Muiño R, Fernadez H, Arean H, Viana JL, Lopez M, Fernandez A, Peña AI. (2005) Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, Vol. 101 (3), 175-191.
55. Nafisi VR, Moradi MH, Nasr-Esfahani MH. (2005) A template matching algorithm for sperm tracking and classification. *Physiol Meas* 26, 639-651.

56. Rajamannen AAJ and Graham EF. (1968) Film Greezing of semen. 6<sup>th</sup>. Inter Congr Animal Reprodu and Artifi Insemination II:1141-1143.
57. Rege JE, Toel F, Mukasa-Mugerwa E, Tembely S, Amindo D, Baker RL and Lahlou-Kassi A. (2000). Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep. II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. *Small Rumin. Res.* 37(3):173-187.
58. Repartido de teriogenologia, (1998) Facultad de Veterinaria. Montevideo, 18 pp.
59. Roberts SJ. (1979) *Obstetricia Veterinaria y Patología de la Reproducción (Teriogenología)*. Hemisferio Sur. Buenos Aires: 1079 p.
60. Rodríguez-Martínez H. (1999) Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal, pp.: 302-316.
61. Rothschild L. (1948) The activity of ram spermatozoa. *S.Expt.Biol.* 25:219-226.
62. Saacke R. (2003). Fertilidad del Toro: Una opinión sobre su estado actual y Perspectivas. *Taurus, Bs. As.*, 5(19): 18-28.
63. Salisbury, G., Van Demark, N., Lodge, J. (1978) *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. 2a. ed. Freeman, 798 p.
64. Sekoni VO, Guftafsson BK, Mather EC. (1981) Influence of wet fixation, staining techniques and storage time on bull sperm morphology. *Nord Vet Med* 33:161-166.
65. Senger PL. (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2<sup>a</sup> ed. Washington. Current Conceptions, 373 p.
66. Silva MR. (2009). Estudio genético quantitativo das características andrológicas de touros jovens da raça Nelore. *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias Agrárias y Veterinárias, Universidad Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
67. Silva MR, Pedrosa VB, Silva JBC, Herrera LGG, Eler JP, Albuquerque LG. (2012), Parámetros Genéticos de las Características Andrológicas en la Especie Bovina. *Archivo Médico Veterinario* 44, 1-11 (2012).
68. Smith, B. A., J. S. Brinks, and G. V. Richardson. 1989. Estimation of genetic parameters among breeding soundness examination components and growth traits in yearling bulls. *J. Anim. Sci.* 67:2892–2896.
69. Soderquist L, Janson L, Larsson K, Einarsson S. (1991) Sperm Morphology and fertility in a AI bulls. *J.Vet.Med.* 38:534-543.
70. Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft. (1998) Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Molecular Reproduction and Development* 50(3):328–333.
71. Thundathil J, Palasz A, Barth AD, Mapletoft R. (2002) Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*, 58 (1), 87-102.
72. Ungerfeld R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea. Tomo 1, 289 p
73. Verstegen J, Iguer – Ouada M, Onclin K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
74. Walker JS, Winet H and Freund M. (1982). A comparison of subjective and objective sperm motility evaluation. *J.Andrology* 3:184-192.