

to timed artificial insemination. Anim Reprod Sci 2015,162:88-94.

• Santos JE, Narciso CD, Rivera F, Thatcher WW, Chebel RC. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. J Dairy Sci 2010,93:2976-88.

• Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. Theriogenology. 2008,70:208-15.

• Souza AH, Viechnieski, S, Lima FA. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. Theriogenology 2009,72:10-21.

• Stevenson JS. Breeding strategies to optimize reproductive efficiency in dairy herds. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2005,21:349-65.

• Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. Theriogenology 1989, 31:149-164.

• Trimmerger, GW, Davis HP. Conception rate in dairy cattle by artificial insemination at various stages of estrus. University of Nebraska, College of Agriculture, Agricultural Experimental extension Research Bulletin 129, 1943.

• Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. Theriogenology 52: 1067-1078, 1999.

## Pruebas de laboratorio para evaluar la capacidad reproductiva del toro

**Dra. Arantxa Echegaray**

Directora del Departamento de I+D. HUMECO. C/Mecánica 11, 22006, Huesca (Huesca, España).  
Tel.: (0034) 974231165. [www.humeco.net](http://www.humeco.net)

### Introducción

En algunos países, las pruebas de calidad seminal para la evaluación reproductiva, son realizadas por expertos en espermatología, en laboratorios de referencia altamente tecnificados y que se espera trabajen con alta exactitud y precisión. Sin embargo, lo más frecuente en la mayoría de países, es que las pruebas de laboratorio las haga el propio veterinario. La evaluación en campo, se beneficia de un resultado inmediato de motilidad espermática, la cual puede variar durante el tiempo de transporte a un laboratorio de referencia, además de que el veterinario de campo cuenta con un mejor conocimiento de los factores ambientales que rodean al animal (anamnesis y examen clínico). Una evaluación seminal correcta no precisa tanto de altas inversiones en tecnología, como de la implementación

correcta de protocolos de evaluación básicos y del conocimiento para saber interpretar los resultados obtenidos. Así, es imprescindible conocer cómo afectan a la calidad seminal, el proceso de degeneración testicular y el proceso de maduración testicular en los toros jóvenes, los dos fenómenos que van a marcar de manera decisiva la capacidad reproductiva de un toro.

Por otro lado, aun tratándose de pruebas básicas, con equipamiento muy sencillo, el protocolo debe estandarizarse, para trabajar con una adecuada precisión. Se debe prestar especial atención a factores como la temperatura o los instrumentos de dilución.

Por lo general y debido a que la rapidez del proceso es mandataria, las pruebas de laboratorio se restringen a: volumen y color del eyaculado, motilidad masal e

individual y quizás la más importante, el estudio citológico de morfoanomalías.

### **Volumen y producción seminal**

El volumen de semen se mide directamente en el tubo colector graduado. Es recomendable hacerlo mediante pesaje y transformación posterior (factor de densidad correspondiente) por la dificultad que ocasiona la presencia de espuma y a veces la inexactitud de la escala en el momento de la lectura directa. El volumen medio de un eyaculado recogido por vagina artificial es de unos 8 ml. Con la electroeyaculación, el resultado puede ser muy variable. Está descrito un aumento de volumen de la eyaculación con la edad del toro hasta los 7 años de edad, permaneciendo constante hasta 9-10 años de edad. El volumen también depende en gran medida de la estimulación sexual y la preparación o periodo de descanso. Se conoce desde antiguo, que el primer eyaculado después de un periodo de descanso sexual contiene muchos más espermatozoides que eyaculados subsiguientes. Para evaluar de forma correcta la producción espermática de un toro, sería necesario realizar previamente, varias colectas sucesivas, hasta que el animal agotase sus reservas epididimarias y se estabilizaran los volúmenes producidos, para que estos sean un reflejo de la cantidad de semen que sus testículos producen diariamente. Este dato puede ponerse en relación con la circunferencia escrotal del animal, ya que existe una relación directa entre volumen testicular y producción espermática. Volúmenes bajos se darán en casos de degeneración testicular, animales muy jóvenes, baja respuesta a la electroeyaculación. Volúmenes excesivos se darán en casos de exceso de estimulación de glándulas anejas, contaminación con orina o hemorragias. La temperatura ambiente óptima para la producción seminal es de 5-20 °C. Procesos de degeneración testicular pueden producir disminución del volumen eyaculado, pudiendo llegar a la azoospermia.

En ocasiones se producen contaminaciones del semen con sangre, orina, secreciones prepucciales, pus u otros, los cuales determinan variaciones del color. La contaminación con orina del eyaculado puede variar su pH al alza o a la baja. Todo depen-

derá del tipo de alimentación del animal. Infecciones de las vesículas seminales también pueden variar el pH. Un pH entre 6,8 y 7,4 se considera normal y no influye significativamente en la calidad espermática. El pH del semen obtenido por electroeyaculación es ligeramente más elevado que el del obtenido por vagina artificial, pero dentro del rango que permite una expresión máxima de la motilidad (7,4-7,6). Un pH bajo (5,5) reduce la movilidad del espermatozoide y la integridad de la membrana, mientras que un pH más alto (8,5) da lugar a la inmovilización de los espermatozoides a través de una reducción significativa en su actividad mitocondrial. La presencia de sangre no produce efectos negativos importantes en el eyaculado. La infección bacteriana (ej.: vesiculitis) también puede producir variaciones importantes del pH, lo cual disminuye la motilidad y viabilidad espermáticas.

### **Motilidad espermática**

#### ***Motilidad masal e individual***

Tanto la motilidad masal como la individual son pruebas subjetivas que pueden verse afectadas por muchas variables. De hecho, se ha sugerido que es, probablemente, la más componente variable del análisis de semen y dicha variabilidad hace que se trabaje con mínimos tan bajos como un 30% de motilidad progresiva, en las evaluaciones de toros de EEUU. La temperatura, el pH, el tiempo o la cantidad de morfoanomalías van a modificar el resultado de una prueba de por sí subjetiva. Es un método económico y fácil de realizar pero es necesario tomar ciertas precauciones para obtener resultados fiables y repetibles. Todo el material a utilizar, incluyendo por supuesto el medio de dilución, debe atemperarse a 37°C (placa calefactora o estufa).

Antes de extraer una alícuota de semen para su evaluación, se deberá mezclar bien la muestra en el contenedor original, volteando suavemente 6 veces. Para tomar la muestra, utilizar una pipeta. Aspirar y soltar varias veces antes de tomar la muestra a observar. El pipeteo no daña al semen, mientras no se haga burbuja.

Para la evaluación de la motilidad masal, la gota de semen que se evalúa debería tener

siempre el mismo tamaño. Sin poner un cubre-objetos, colocar el porta-objetos en el microscopio y observar con el OB 10X. Se verá el oleaje producido por el movimiento de los espermatozoides. A mayor fuerza de oleaje, mayor calidad espermática. Existen diferentes sistemas de clasificación, lo cual añade aún más variabilidad al resultado. Se recomienda llegar a un consenso, al menos a nivel nacional. El protocolo debe ser siempre el mismo para todos los exámenes y a ser posible, también el observador que los efectúe.

Para evaluar la motilidad individual, la concentración ideal de la muestra debe estar entre los  $25-50 \times 10^6$  spz/ml. El diluyente que se utilice en esta dilución no debe alterar el patrón de motilidad espermática. Si la gota de semen sobre la que se examina la motilidad es demasiado grande o gruesa, el observador verá a la vez varias capas de fluido y, en estas condiciones, se tiende siempre a sobreestimar el porcentaje de motilidad. La forma de conseguir una única capa de células de en torno a 20 micras de altura es emplear mayores volúmenes, a medida que aumenta el tamaño del cubre-objetos empleados: 6 microlitros para cubre-objetos de 18x18 mm., 8 microlitros para 20 x 20 mm y 10 microlitros para cubre-objetos de 22 x 22 mm. Deben de examinarse 5 campos alrededor del centro del cubre-objetos y hacer la media de los porcentajes observados. La motilidad en los bordes del cubre-objetos disminuye más rápidamente como consecuencia de la deshidratación y exposición al aire. El protocolo debe ser siempre el mismo para todos los exámenes y a ser posible, también el observador que los efectúe. En la preparación húmeda podremos observar también otros elementos, como acúmulos de espermatozoides, aglutinaciones espermáticas, células redondas bacterias, etc.

### ***Motilidad objetiva (sistema computerizado de análisis espermático CASA)***

La evaluación subjetiva de la motilidad espermática está sujeta al error humano lo que ha llevado al desarrollo de métodos automatizados objetivos. Los sistemas CASA encuentran su utilidad aún a pesar de su alto coste (20.000-50.000 euros). Recientemente, se están incorporando al mercado, sistemas CASA portátiles acoplados a tablets, de coste mucho más reducido.

Estos aparatos graban secuencias de video de una muestra colocada al microscopio: entre 20-30 secuencias a una velocidad de 30-60 imágenes/Segundo y utilizan algoritmos matemáticos para distinguir entre espermatozoides y otros objetos, para después reconstruir la trayectoria de todos y cada uno de los espermatozoides detectados. Cada espermatozoide es clasificado como móvil o inmóvil y se calcula asimismo la concentración espermática. Además la motilidad se caracteriza en detalle obteniéndose los siguientes parámetros: MOT=Motilidad total (%), PMOT=Motilidad progresiva (%), VCL= velocidad curvilínea media, VAP= velocidad de la trayectoria media, VSL= velocidad rectilínea media, Rectitud (STR)=VSL/VAP, Linealidad (LIN) =VSL/VCL, ALH=Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF=Frecuencia de batido de la cola

Los modelos actuales tienen también la posibilidad de obtener los porcentajes de anomalías de cola, gota proximal y distal, aunque la precisión y exactitud de de estas aplicaciones de estudio de morfoanomalías permanece sin determinar. La concentración máxima a la cual debe evaluarse una muestra de semen en el sistema CASA es de  $50 \times 10^6$  spz/ml, con concentraciones recomendadas de  $25 \times 10^6$  spz/ml.

### ***Morfología espermática***

En nuestra opinión, la mejor técnica para la evaluación de las morfoanomalías espermáticas es la tinción con eosina nigrosina. Esta técnica, es muy barata, puede utilizarse con microscopios sencillos de campo claro, permite un mejor posicionamiento de los espermatozoides (si se compara con la técnica de fijación en glutaraldehído) y permite también una visualización más clara de los acrosomas. Existen más de 10 protocolos o fórmulas para la preparación de la tinción de eosina-nigrosina. Las más adecuadas son la fórmula de Hancock y la de Mortimer, con bajas cantidades de eosina (la eosina es tóxica para los espermatozoides y en proporciones altas puede aumentar artificialmente el porcentaje de espermatozoides muertos) y porque su formulación da un compuesto que roza la isoosmolaridad (250 mOsm/L, esto es, cuya cantidad de solutos es similar a la del suero o el semen (300 mOsm/L). Otras fórmulas son claramente hipo osmó-

ticas produciendo enrollamientos de la cola de los espermatozoides y falseando por tanto las anomalías de cola. Para trabajar con una precisión adecuada (coeficiente de variación inferior al 10%) se deben evaluar al menos 200 espermatozoides en cada muestra. Si esto no fuese posible, por problemas de tiempo, es interesante saber que una vez hecha la extensión, la tinción de eosina-nigrosina se conserva a temperatura ambiente durante meses, por lo que siempre puede realizarse una evaluación diferida.

Las anomalías del espermatozoide se clasificaron primero en función de su origen, en primarias, si tienen su origen en la espermatogénesis, secundarias, si se producen durante el tránsito por el canal reproductor o terciarias, si son originadas con posterioridad a la eyaculación. Esta clasificación se ha revisado dando lugar a una segunda clasificación que divide las anomalías en mayores o menores, según su efecto en la fertilidad. Por último, la clasificación más vigente sería aquella que divide las anomalías en compensables o incompensables, en función de la posibilidad de compensar su presencia en el eyaculado con un aumento en el número total de espermatozoides en las dosis de inseminación. Las primeras son aquellas que impiden al espermatozoide llegar hasta los oviductos (ej.: colas dobladas), mientras que las segundas impiden fertilizar al ovocito y/o el desarrollo embrionario temprano (ej.: gota citoplásmica proximal).

El estudio de las morfoanomalías espermáticas nos dice mucho sobre el semental y su pasado inmediato. La edad, cualquier o la degeneración testicular marcan el correcto desarrollo de la espermatogénesis y la huella de este insulto va a aparecer en el eyaculado.

### ***Anomalías espermáticas y degeneración testicular***

La palabra degeneración tiene connotaciones de gravedad y permanencia. Sin embargo, el término degeneración testicular define cambios del parénquima testicular de leves a graves, que pueden ser reversibles o irreversibles. Podemos definir por tanto, diferentes estadios del proceso que aparecerán o no en función de la duración e intensidad de la causa desencadenante:

### **Estadio 0. Espermatogénesis normal.**

Túbulos con membrana basal fina, así como epitelio germinal normal con progresión ordenada de espermatogonias a espermatoцитos con grupos de espermátidas y espermatozoides maduros. La espermatogénesis es normal y el eyaculado presenta una casi ausencia de anomalías de cabeza, gota proximal o pieza intermedia.

### **Estadio 1. Daños al final de la meiosis y en la fase de espermátida**

Es la afectación más común. El túbulo presenta un aspecto normal, pero se producen diversas alteraciones subcelulares que afectan, sobre todo a la última etapa de la meiosis y a la etapa de espermátidas. Aparece un cuadro de alteraciones conjuntas, claramente identificable en el eyaculado.

#### **(1) Macro y micro cabezas**

Aparecen alteraciones en el huso meiótico, con reparto desigual de cromosomas, que dan lugar a la aparición de espermatozoides con micro y macro cabezas.

#### **(2) Cabezas piriformes**

El momento de la aparición de los defectos que dan lugar a espermatozoides piriformes es también la fase de espermátida, cuando el núcleo se aplana y se alarga y la cromatina se condensa. Los espermatozoides con cabezas piriformes tienen una capacidad reducida para unirse a y penetrar la zona pelúcida y aquellos que consiguen fertilizar a un ovocito, tienen una capacidad reducida para producir embriones viables.

#### **(3) Cabezas sueltas**

La presencia de cabezas sueltas de origen espermatogénico se achaca a la malformación de la placa basal, una estructura de origen nuclear que recubre la fosa de implantación y conecta la cabeza a la cola. Debido a esta anomalía, la cabeza y la cola se mantienen juntas solamente por la membrana plasmática y en estas circunstancias, la cabeza finalmente se suelta, generalmente cuando el espermatozoide atraviesa la rete testis o la cabeza del epidídimo. Las cabezas sueltas también pue-

den aparecer en caso de vesiculitis, epididimitis o semen viejo. El diagnóstico diferencial se hace rápidamente. La cabeza suelta como consecuencia de un proceso degenerativo del testículo aparecerá acompañada de otras anomalías mayores como microcabezas o cabezas piriformes. Incluso muchas microcabezas serán a la vez cabezas sueltas. La cabeza suelta como consecuencia de necrospermia o senescencia testicular, aparecerá en muestras de semen con vitalidad reducida y un número reducido de acrosomas normales.

#### **(4) Espermatozoides con gota proximal**

Aparecen alteraciones en la formación de la gota citoplásmica proximal que impiden su correcta maduración y hacen que esta permanezca en el espermatozoide eyaculado. Los espermatozoides con gota proximal no son capaces de penetrar la zona pelúcida y por tanto, esta anomalía sería clasificada como compensable. Sin embargo, se ha comprobado que la presencia de más de un 30% de gotas proximales en un eyaculado es un indicador de inmadurez y baja capacidad de fertilización y desarrollo embrionario que afecta a la totalidad del eyaculado.

#### **(5) Vacuolas nucleares, acrosomas en nudo o dañados**

También, en menor medida, van a aparecer espermatozoides con vacuolas nucleares y acrosomas en nudo. Los espermatozoides con vacuolas nucleares son menos capaces de unirse y penetrar la zona pelúcida, pero, una vez que lo han hecho, son capaces de iniciar y mantener el desarrollo embrionario temprano, lo que sugiere que estas anomalías son compensables. Aunque el acrosoma en nudo (Knobbed acrosome) se ha descrito como defecto genético en individuos de la raza Holstein, Angus y probablemente Charolés, también puede aparecer en pequeñas proporciones, en esta etapa de la degeneración testicular. Los espermatozoides afectados por acrosomas en nudo son incapaces de penetrar la zona pelúcida y son, como tales, anomalías compensables.

#### **(6) Otras alteraciones**

Podemos encontrar en pequeñas proporciones, alteraciones en la formación de la pieza intermedia y su conexión a la cabeza, dando lugar

a anomalías de la pieza intermedia o alteraciones graves en la formación del flagelo, como por ejemplo la ausencia de flagelo. La cola en muñón o "tail stump defect" se debe a un desarrollo vestigial de la cola durante una espermatogénesis anormal.

### **Estadio 2. Descamación e hipoespermatogénesis.**

Si la degeneración progresa, aparece una descamación de las células del epitelio seminífero, con posible acumulación de estas células en el lumen tubular y adelgazamiento de la pared del túbulo seminífero. ¿Qué ocurre con estas células descamadas? Por lo general, no llegan o llegan pocas al eyaculado. Se ha sugerido que, al menos las espermátidas son absorbidas de manera selectiva en el epidídimo.

El túbulo afectado presenta un número reducido de todas las etapas de las células germinales, pero todas existen, lo que se traduce en una disminución del número de espermatozoides producidos. La hipoespermatogénesis puede variar en gravedad desde leve (<10% de los túbulos afectados) a severa (> 75% de los túbulos afectados). En la forma severa tendremos una oligospermia o azoospermia. La reducción de la producción espermática que persiste más allá de 30 días después del comenzar la causa desencadenante, indican cambios degenerativos que afectan ya a la etapa anterior: los espermátocitos. Este estadio de degeneración testicular es reversible, en función de intensidad y porcentaje de túbulos afectados.

### **Estadio 3. Degeneración irreversible con azoospermia.**

Concurren uno o varios de estos fenómenos: Síndrome sólo células de Sertoli: membrana basal engrosada, túbulos de tamaño normal o ligeramente disminuido en diámetro, pero contienen sólo las células de Sertoli.

Fibrosis e hialinización de túbulos: los túbulos son más pequeños en diámetro con una gran parte de la membrana basal engrosada, fibrosis peritubular y colagenización tubular.

### ***Diagnóstico y pronóstico de la degeneración testicular a través del espermiograma***

En el análisis de laboratorio, podemos monitorizar el proceso degenerativo

gracias al estudio de las morfoanomalías espermáticas. El proceso degenerativo, se traduce en una secuencia de eventos de anomalías en los eyaculados, partiendo del momento en que comienza a actuar el factor desencadenante (Semana 0):

- Semana 0-1: motilidad baja y baja congelabilidad, por la alteración epididimaria
- Semana 1 en adelante: comienzan a exteriorizarse células con lesiones producidas en el estadio 1 de degeneración: cabezas sueltas, microcabezas, cabezas piriformes, macrocabeza, vacuolas nucleares, gotas proximales por encima del 15%, lesiones del acrosoma y disminución de producción espermática por degeneración de espermátidas.

Si la causa desencadenante ha actuado poco tiempo (no más de 48 horas) este cuadro desaparecerá del eyaculado en unos 50 días.

La causa más conocida de degeneración es el calor. La temperatura y tiempo mínimos necesarios para producir un efecto agudo con daños subcelulares del túbulo seminífero es de 30 ° C y 72 h, aunque se han documentado casos en toros con tan sólo 12 horas de exposición. En toros bajo estrés crónico (ej.: semanas de calor), el efecto o periodo de recuperación puede alargarse hasta 10 a 14 semanas después de desaparición de la fuente de estrés, pudiendo aparecer algunos casos transitorios de toros en estadio 2 o hipoespermatogénesis... Un estrés muy fuerte (cambio muy brusco de temperaturas) puede provocar afección grave de los túbulos y la no recuperación de un 20% o más de los toros afectados. En estos toros el proceso de fibrosis (estadio 3) se instala en el testículo.

Se creía que el factor clave para una posible recuperación del toro era la persistencia de espermatogonias y células de Sertoli en el túbulo seminífero. Teóricamente, a partir de estas células, puede regenerarse de nuevo todo el epitelio tubular. Sin embargo, parece ser que el grado de fibrosis peritubular instaurado, será el que determine, la llegada de nutrientes y oxígeno al túbulo y su posible supervivencia.

En este sentido, algunas razas como la Blanco Azul Belga son especialmente sensibles a muchas fuentes de estrés:

temperaturas elevadas, aumento o disminución del concentrado en la ración, cojera o reubicación del toro, van a desencadenar este fenómeno. Se ha sugerido que la alta cantidad de tejido conectivo en los testículos de los toros de esta raza, es responsable de su susceptibilidad a la degeneración testicular.

En la práctica, en los procesos degenerativos del testículo aparecen diferentes estadios de afección tubular dentro del mismo órgano. La proporción de túbulos afectados (lesión del parénquima focal, multifocal o difusa) y el grado de afectación (desde ligeros problemas en la espermatogénesis hasta azoospermia) son los factores que van a determinar la calidad de los eyaculados.

En los toros jóvenes también existe una cierta susceptibilidad a los procesos degenerativos. Mientras que la hipoplasia se ha definido como un condición hereditaria con testículos pequeños produciendo poco semen de mala calidad, la degeneración testicular en animales jóvenes se caracteriza por una producción inicial de esperma relativamente normal para su edad, pero que, ante una fuente de estrés, dejan de producir semen de buena calidad y ya no se recuperan.

### ***Morfoanomalías como indicadores de maduración en toros jóvenes***

La espermatogénesis se inicia alrededor de 3 a 4 meses de edad. El momento de la pubertad en los toros ha sido definido como el tiempo en el que un eyaculado contiene 50 millones de espermatozoides con un mínimo de 10% de motilidad. Esto ocurre en una circunferencia escrotal de aproximadamente 28 cm y alrededor de 42 semanas de edad. Entre la pubertad y la madurez (en torno a los 18 meses), un toro joven sano, va a eyacular cantidades decrecientes de espermatozoides con anomalías de cabeza y gota proximal. Por tanto, la proporción de estas anomalías en el eyaculado, será un indicador de madurez del toro.

### ***Anomalías de origen epididimario***

Las anomalías de cola son casi siempre de origen epididimario. Esta anomalía es compensable y menor. Cambios de la fluidez de membrana producen doblamientos más o menos intensos

del flagelo, dando lugar a colas dobladas en látigo, en ángulo recto o en horquilla (DMR). La acumulación de líquido en cola de epidídimo puede provocar un shock hiposmótico con enrollamiento del flagelo. Nosotros hemos detectados casos crónicos con alteración fibrótica de la cola de epidídimo de carácter generalmente unilateral.

La degeneración testicular, puede producir de manera secundaria, anomalías en la forma del flagelo, a través de alteraciones en niveles hormonales o como consecuencia de la producción de espermatozoides que con defectos en su estructura de membrana que los predisponga a este defecto.

Tras la eyaculación, la exposición de los espermatozoides a un entorno hipotónico (ej.: entrada de agua en la vagina artificial o tubo de colecta) o un ambiente demasiado frío durante la colecta inducen también curvamiento del flagelo.

El defecto Dag nombrado así en honor al toro Jersey en el que se identificó por primera vez, puede definirse también como una cola enrollada en ovillo. Es un defecto mayor, que puede reflejar perturbación en el testículo o epidídimo y puede estar presente (en proporciones inferiores al 4%) en el semen normal. Niveles por encima del 50% puede tener implicaciones graves de fertilidad.

De manera característica, en los procesos de degeneración testicular, y de manera previa a estas alteraciones testiculares, suelen darse alteraciones de la función epididimaria, con cambios de fluidez de membrana que afectan a la motilidad y congelabilidad de los eyaculados.

Los espermatozoides con gota distal son normales en cola de epidídimo e incluso, se sabe que el semen de esta zona es más fértil y congela mejor que el semen eyaculado. Durante la eyaculación las gotas distales se desprenden al contacto con el plasma seminal. Cuando aparece una gran cantidad de gotas distales en semen eyaculado debemos preguntarnos sobre todo por alteraciones en la composición del plasma seminal.

Aunque la persistencia de gota proximal, tiene su origen casi siempre en alteraciones testiculares o animales inmaduros, también aparecen en toros sobreexplotados, como consecuencia del agotamiento de las reservas epididimarias.

### **Otras anomalías**

La pseudo-gota citoplásmica proximal se caracteriza por un engrosamiento local de la pieza intermedia. Se diferencia de la gota proximal en que ocurre en regiones en las que rara vez se encuentran gotas, en medio de la pieza intermedia. También es más probable que sea de forma irregular y visualmente más denso que las gotitas. Generalmente son acúmulos de gránulos y mitocondrias. Reflejan problemas en la espermatogénesis.

La pieza intermedia en sacacorchos es un defecto poco común. Se produce una distribución irregular de las mitocondrias en forma de sacacorchos. El origen puede ser genético o ambiental.

Algunos toros, un porcentaje inferior al 5%, acumulan esperma senescente en el tracto reproductivo, concretamente en los epidídimos y las ampollas de los conductos deferentes: estos toros pueden dar hasta 20-40 ml de semen concentrado de una sola vez. La mayoría de los espermatozoides han muerto y muchas veces el porcentaje de cabezas sueltas se eleva presumiblemente debido a la senescencia. En estos casos, las cabezas espermáticas tienen una morfología normal ya que el problema no está relacionado con una alteración de la espermatogénesis. La acumulación de espermatozoides en los toros, se ha asociado con trastornos de la columna. En estos casos, son necesarias eyaculaciones frecuentes durante un periodo de alrededor de 1 semana para el agotamiento de estas reservas acumuladas

### **Células redondas**

La técnica de Diff Quick es una técnica complementaria a la eosina-nigrosina, ya que sirve para investigar la naturaleza de las células redondas en el eyaculado, mientras que no es tan adecuada para detectar anomalías como las gotas citoplásmicas. En efecto, dentro de las llamadas células redondas, detectadas a microscopía de campo claro o contraste de fases, podemos encontrar tras la tinción 3 grandes tipos de estructuras: 1) células de la meiosis, desde espermatoцитos a espermátidas 2) células inmunitarias, generalmente leucocitos 3) otros: glóbulos rojos, granos de polen, etc.

Esta técnica es igualmente sencilla, barata y fácil de implementar en campo. Ade-

más, de manera novedosa, permite investigar el estado de condensación de cromatina en los espermatozoides, ya que tiñe de diferente color aquellos con cromatina descondensada.

Básicamente, se fija extensión de semen por calor y se sumerge durante 5 segundos en 3 pigmentos consecutivos. Tras el secado al aire, es importante visualizar la preparación con contraste de fases, ya que en caso contrario, la muestra permanece casi invisible.

El Diff Quick se empleará de manera rutinaria en aquellos casos en los que la muestra seminal ha sido escasa y/o poco concentrada. También en todos los casos con células redondas. Si es necesario se recurrirá a concentrar la muestra, por centrifugación o dejándola reposar en frío y tomando una alícuota del pellet formado para la tinción. La tinción ayudará a determinar si hay un problema de espermatogénesis, una infección o simplemente, ha habido una mala respuesta a la electroeyaculación.

Por lo general el porcentaje de espermatozoides con cromatina descondensada no supera el 15% en toros. Además, en gran parte de los casos coincide que el espermatozoide afecta tiene una anomalía de cabeza. Toros con porcentajes superiores al 15%, pueden ser subfértiles,

### Otras pruebas

La concentración de espermatozoides en un eyaculado recolectado por electroeyaculación puede ser afectada por una variedad de factores y, en general se le da menos valor que a la motilidad o la morfología. A veces, se realiza sólo un estimado a partir de la turbidez de la muestra. Una muestra muy translúcida contendrá menos de 250 millones de espermatozoides por mililitro, mientras que una muestra cremosa probablemente contener al menos desde 750 millones hasta 1000 millones de espermatozoides por mililitro. Cuando se utilizan cámaras de recuento, fotómetros o sistemas CASA es necesario seguir un estricto protocolo de dilución con instrumental de precisión. En nuestra experiencia, una pipeta no verificada, es casi siempre la fuente de error sistemático de muchos laboratorios de espermatología. El procedimiento de verificación es sencillo, barato y puede hacerlo cualquier clínico con la ayuda de una balanza de precisión.

## Bibliografía

- Amann, R. et al. (1986) 'Prepubertal changes in the hypothalamic-pituitary axis of Holstein bulls.', *Biology of reproduction*.
- Barth, A. D. et al. (2008) 'Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality', *Animal Reproduction Science*, 106(3-4), pp. 274-288. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.05.002.
- Barth, A.D. et al. (1994) 'The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls.', *ncbi.nlm.nih.gov*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686741/>
- Blanchard, T. L. et al. (1991) 'The causes of pathologic changes of testicular degeneration in large animals', *Vet. Med.*, 86, pp. 531-536.
- Brito, L. de (2006) 'Nutrition, metabolic hormones, and sexual development in bulls'. Available at: <http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk3/SSU/TC-SSU-04012006184638.pdf> (Accessed: 7 April 2017).
- Brito, L. F. C. (2014) *Animal Andrology Theories and Applications*, *Animal Andrology in Cattle (Bos taurus)*.
- Brito, L. F. C. et al. (2016) 'Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration', *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.002.
- Casas, E., Ford, J. and Rohrer, G. (2010) 'Quantitative Genomics of Male Reproduction', *Reproductive Genomics in*. Available at: <http://online-library.wiley.com/doi/10.1002/9780813810898.ch3/summary>
- Chenoweth, P. J. (2005) 'Genetic sperm defects', *Theriogenology*. Elsevier, 64(3), pp. 457-68. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.005.
- Chenoweth, P. J. and Lorton, S. P. (no date) *Animal andrology : theories and applications*.
- Contri, A. et al. (2010) 'Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa', *theriojournal.com*. Available at: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(10\)00140-8/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(10)00140-8/abstract)
- Coulter, G. H. and Kozub, G. C. (1984) 'Testicular Development, Epididymal Sperm Reserves and Seminal Quality in Two-Year-Old Hereford and Angus Bulls: Effects of Two Levels of Dietary Energy', *Journal of Animal Science*, 59(2), p. 432. doi: 10.2527/jas1984.592432x.
- Amann, R. A.-D. (1962) 'Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and tes-



ticular germ cell degeneration', Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aja.1001100107/full>

• Evans, A. C. O. et al. (1996) 'Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls', *Theriogenology*. doi: 10.1016/0093-691X(96)00190-2.

• Farrell, P. et al. (1996) 'Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility', Elsevier. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98000363>

• FARRELL, P. et al. (1998) 'Media and Dilution Procedures Tested to Minimize Handling Effects on Human, Rabbit, and Bull Sperm for Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)', Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.1996.tb01785.x/full>

• Gabor, G. et al. (1998) 'Morphologic, endocrine and thermographic measurements of testicles in comparison with semen characteristics in mature Holstein-Friesian breeding bulls', *Animal reproduction*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432098000773>

• Hirsbrunner, G. et al. (2003) 'Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls LFC Brito, AEDF', *Animal Reproduction*.

• Hopper, R. M. (2014) *Bovine reproduction*. Wiley.

• Iwasaki, S. et al. (1989) 'Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from in vitro fertilization', *Gamete Research*, 22(1), pp. 83-91. doi: 10.1002/mrd.1120220109.

• Kastelic, J. and Thundathil, J. (2008) 'Breeding Soundness Evaluation and Semen Analysis for Predicting Bull Fertility', *Reproduction in Domestic Animals*, 43, pp. 368-373. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01186.x.

• Paniagua, R. et al. (1991) 'Ultrastructure of the aging human testis', *Journal of Electron Microscopy Technique*, 19(2), pp. 241-260. doi: 10.1002/jemt.1060190209.

• Cooper T. C.-H. and 2005, undefined (no date) 'Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing?', *academic.oup.com*. Available at: <https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/20/1/9/671540>

• Sidibe, M. et al. (no date) 'Effects on testosterone, LH and cortisol concentrations, and on testicular ultrasonographic appearance of induced testicular degeneration in bulls.', *europemc.org*. Available at: <http://europemc.org/abstract/med/1442365>

• Thundathil, J. et al. (no date) 'The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets', Elsevier. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000002311>

## Servicios veterinarios, roles y beneficios de los diferentes actores en un asesoramiento profesional

**M.V. Tomás Díaz.**

Asesor Técnico Comercial, Laboratorio Zoetis.

El título de "veterinario", abarca un sinnúmero de áreas donde los profesionales podemos desempeñar lo aprendido durante nuestra carrera de grado. En el área de la medicina o la producción solamente, podemos dividir las en grandes animales o pequeños animales, a su vez los grandes animales, podemos sub dividirlos en rumiantes, o monogástricos, y los rumian-

tes pueden ser rumiantes mayores o rumiantes menores, y así sucesivamente en otras áreas, ya sea en la nutrición, clínica, cirugía, investigación, bromatología, legales, áreas comerciales, asuntos regulatorios, etc, etc.

Yendo específicamente al veterinario rural, normalmente ejerce la profesión de