

Capítulo L

Factores que determinan la congelabilidad del semen bovino

Oscar Vera
María Gladys Muñoz

La criopreservación y la inseminación artificial en el bovino son, desde hace muchos años, las biotecnologías reproductivas más utilizadas a nivel mundial para la mejora genética en producción animal. Son evidentes las notables ventajas, tanto sanitarias, genéticas y productivas, que ofrece la utilización del semen congelado-descongelado con respecto al semen fresco y/o refrigerado (Cardellino *et al.*, 2003). Los criadores de toros reproductores generalmente solicitan evaluaciones reproductivas rutinarias como son los exámenes andrológicos, con la finalidad de confirmar su potencial fértil antes de comprar o vender un costoso reproductor. También estas evaluaciones se utilizan para comprobar su producción espermática diaria, en especial, en reproductores de alto valor genético, además para valorar el potencial de un reproductor como donante de semen para inseminación artificial (IA) con semen congelado o refrigerado.

La incorporación de un toro en un Centro de inseminación artificial (CIA) se realiza en función de su valor genético, considerando su ascendencia (pedigrí), sus características de desempeño individual y su descendencia (progenie). La capacidad fértil de este reproductor, es estimada a nivel de un CIA por medio de un examen clínico completo y por la apreciación de la calidad del semen producido. Tales evaluaciones reproductivas dependen de que se logre recolectar el semen de manera apropiada y sobre todo, de una precisa valoración del mismo. Una evaluación de la aptitud reproductiva, incluirá una prueba de libido o de capacidad de servicio, examen de los genitales externos, medición testicular, palpación de los testículos, examen de los genitales internos y una evaluación seminal, así como ecografías de testículos, glándulas vesiculares y próstata en algunos casos. Además es necesario realizar pruebas microbiológicas en el semen para determinar enfermedades de transmisión sexual, especialmente Brucelosis, Paratuberculosis, IBR, etc., que son parte crucial del examen andrológico.

Cuando se describe el examen andrológico en toros, la evaluación de congelabilidad es poco utilizada para apreciar la capacidad y calidad de una muestra para ser

congelada, sin mayores pérdidas de las células. Para determinar si una muestra de semen es congelable o no, se procede a la evaluación del eyaculado, determinando las variables de calidad seminal como, el volumen del eyaculado, la movilidad masal, la movilidad individual, el porcentaje de atipias en la morfología espermática y la concentración espermática, haciendo énfasis en los parámetros de viabilidad espermática como la movilidad, la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma. Estos últimos son extremadamente sensibles en la etapa de enfriamiento del semen diluido a una temperatura entre 2-8°C, así como al proceso de congelación. Esta congelabilidad del semen bovino solo puede evaluarse cuando se lleva a cabo la dilución y congelación de una muestra de semen que ha pasado las pruebas de calidad seminal y más aún, se verifica posteriormente, una vez que se descongela esa muestra, la cual debe tener una movilidad (motilidad individual) superior al 25-30% (Decuadro-Hansen, 1997; 2000).

Pocas son las pruebas de laboratorio que se pueden realizar para conocer este parámetro. Como regla general, se seleccionan los toros jóvenes que presentan una buena circunferencia escrotal (CE), una concentración espermática elevada, una buena movilidad individual antes y después de la congelación y un bajo porcentaje de anomalías espermáticas. Se recomienda la evaluación de 5 colectas dobles (10 eyaculados, siendo los dos primeros eliminados). Además de los parámetros seminales evaluados ya mencionados, se incluye una determinación de la presencia de leucocitos, que pudiera revelar la presencia de una infección a nivel del tracto reproductivo que deteriora la calidad seminal. Como regla general, 15-20% de los toros jóvenes son eliminados por este único test. Mientras más elevada es la movilidad individual post-congelación mejor será su capacidad de congelabilidad y capacidad fecundante.

Muchos factores pueden influenciar la congelabilidad del semen bovino. Por tal motivo, el objetivo de este artículo es analizar los factores que afectan la congelabilidad del semen bovino y a los cuales se les pueden atribuir variaciones en la aptitud del semen para soportar la crioconservación, como por ejemplo, calidad del eyaculado, edad, estación del año, familia, efecto de la dilución del semen a alto o a bajo número de espermatozoides por dosis de IA y el manejo reproductivo de los sementales. Este aspecto cobra especial importancia en la selección de los reproductores de ganadería de doble propósito para poder diseminar las características y los parámetros de producción deseados y contribuir al desarrollo de esta ganadería mediante el uso de dosis para lograr una IA de óptima calidad.

Todas las recomendaciones que a continuación se plantean son parte del trabajo y los protocolos seguidos por el laboratorio de procesamiento de semen del Instituto de Reproducción Animal (FCV-UCV, Maracay) para contribuir al desarrollo de la ganadería en Venezuela.

FACTORES QUE AFECTAN LA CONGELABILIDAD DEL EYACULADO

La aptitud del semen bovino para soportar la crioconservación o congelabilidad es el resultado de la calidad intrínseca del eyaculado y del efecto del ambiente inmediato, como lo es el manejo del toro antes de la recolección del semen, la frecuencia de

recolección del eyaculado, el estrés del semental, enfermedades transitorias, manipulación adecuada del semen una vez recolectado e incluso la alimentación previa que puede afectar la calidad del semen (Vera, 2001). El proceso de congelación del semen bovino depende de una serie de interacciones complejas entre la calidad original del eyaculado, el tipo de diluyente empleado, la velocidad de enfriamiento y de congelación seguida en el proceso de congelación–descongelación como del tamaño y tipo de pajuela empleado para el semen (Vera *et al.*, 2002). Los principales factores o aspectos que afectan la congelabilidad del semen son: el manejo del semental previo a la colecta del semen; la calidad del semen; la composición del diluyente y el efecto de la dilución del eyaculado y el control microbiológico del semen fresco.

MANEJO DEL SEMENTAL

Uno de los problemas de los CIA es que la calidad del eyaculado no es constante, existiendo mucha variación entre un eyaculado y otro, cuando no se cumple con un protocolo de recolección periódica del semen, como normalmente pudieran ser dos eyaculados, una vez por semana y siete días de reposo o abstinencia como máximo). Su objetivo es uniformizar la calidad del eyaculado, obtenido con los diferentes métodos de recolección de semen. De esta manera, se obtendrán muestras seminales recién colectadas, más uniformes y de alta calidad.

La muestra seminal recién colectada está influenciada por la preparación sexual antes de la colecta; el trabajo con los toros en la sala de monta; el régimen de recolección periódico, la alimentación y el control sanitario. En la sala de monta, el trabajo realizado por el equipo de un CIA comprende una fase de preparación sexual o periodo de pre-excitación y una fase de excitación propiamente dicha, compuestas de falsas montas, de preferencia sobre un maniquí. Los trabajos durante la colecta de semen afectan de manera importante la calidad del semen, por lo cual, es importante garantizar la calidad y la limpieza de la sala de monta, el tipo y preparación de la vagina artificial y el ritmo o frecuencia de colección. Lograr optimizar la frecuencia de colecta a los efectos de reducir las reservas de semen envejecido en el epidídimo y aumentar el tránsito epididimario es uno de los métodos más antiguos para mejorar la calidad del semen (Amman & Almquist, 1961). Así se reemplazan las reservas de espermatozoides envejecidos en el epidídimo por los espermatozoides producidos más recientes, más viables y más capaces para soportar mejor el proceso de congelación.

Es altamente recomendado estimular sexualmente los toros antes de la colecta. Esta práctica de manejo puede dividirse en dos fases: una pre-excitación sexual que suele durar entre 15-20 minutos en toros lecheros y 30 minutos en toros de carne de razas europeas y doble propósito; esta fase consiste en colocar los animales en un brete contiguo a la sala de colecta que permita que los toros puedan observar a otros toros saltando. La otra fase sería la de montas falsas, la cual continúa siendo una de las mejores técnicas para producir semen en mayor cantidad y calidad. En toros de razas europeas, se practican dos montas falsas con 5 minutos de espera restringida al lado del maniquí y una tercera monta falsa antes de colectar (Schenk, 1998).

En general, los CIA de Europa y América del Norte usan una frecuencia de colecta de dos eyaculados, dos veces por semana. Es interesante remarcar que es común

que los toros colectados con este ritmo presentan un semen de calidad post-descongelación superior cuando se trata de los segundos eyaculados colectados (Schenk, 1998). En nuestra experiencia, en condiciones tropicales, utilizando toros Brahman y mestizos doble propósito, dos eyaculados una vez por semana mantienen un semen bastante uniforme con respecto a sus características seminales (Vera *et al.*, 1998).

CRITERIOS DE CALIDAD EN UN CIA

Un eyaculado puede ser congelado si responde a las siguientes exigencias en la evaluación seminal, los cuales son valores óptimos, aunque su exigencia dependerá de cada CIA. En este caso los criterios de evaluación han sido tomados de Decuadro-Hansen (1997):

Criterios	Frecuencia de control	Límite de utilización
Aspecto	c/eyaculado	Alteraciones ausentes
Concentración espermática	c/eyaculado	$\geq 300 \times 10^6$ esp/mL
Movilidad masal	c/eyaculado	≥ 3
Movilidad individual	c/eyaculado	$\geq 70\%$
Espermatozoides anormales (%)	Sobre los 2dos eyaculados de las 3 primeras colectas cuando comienza a producir semen; luego sobre el 2do eyaculado 1 vez/mes	$\leq 25\%$
Espermatozoides con anomalías mayores (primarias)		$\leq 15\%$

El semen bovino destinado a la congelación e inseminación artificial debe responder a los siguientes criterios de calidad:

- **Calidad sanitaria.** Debe estar libre de todo agente patógeno transmisible por semen.
- **Calidad biológica.** La muestra descongelada debe tener un mínimo de 8 millones de espermatozoides con movilidad progresiva rectilínea (MPR) por pajuela después de la congelación y $> 25\%$ de espermatozoides con MPR (Decuadro-Hansen, 1997). La muestra después de la descongelación debería tener entre 6 y 8 millones de espermatozoides con MPR, cuando el semen posee $> 30\%$ de espermatozoides con MPR y un porcentaje de anomalías morfológicas $< 25\%$. Debería tener entre 6 y 8 millones de espermatozoides con MPR, cuando el semen posee $> 30\%$ de espermatozoides con MPR, además de datos de fertilidad. Sobre 300 primeras inseminaciones, el porcentaje de no retorno a los 60/90 días debe ser equivalente al obtenido con más de 8 millones de espermatozoides con MPR.

La concentración óptima de espermatozoides por dosis es toro-dependiente; en el 20% de los toros no existe correlación significativa entre la concentración por dosis y la tasa de no retorno (Decuadro-Hansen, 1997). El número de espermatozoides con MPR de una pajuela se obtiene multiplicando el porcentaje de es-

permatozoides con MPR por el número de espermatozoides totales en la pajueta.

- **Calidad bacteriológica.** El objetivo del CIA es lograr que el 95% de las pajuelas contengan menos de 500 Unidades Formadoras de Colonias de bacterias (UFC) totales (Decuadro-Hansen, 1997).
- **Identificación correcta.** La pajueta debe estar correctamente identificada. En primer lugar, la identificación debe corresponder al semen del toro contenido en la pajueta; en segundo lugar, la identificación puede presentar exigencias reglamentarias (ej. en la CEE se identifica el status sanitario del toro para IBR).

COMPOSICIÓN DEL DILUYENTE Y EFECTO DE LA DILUCIÓN DEL EYACULADO

La criopreservación, cuyo propósito es garantizar la supervivencia del semen, causa daños irreversibles en la membrana plasmática, lo que conlleva a la muerte de un gran número de espermatozoides. En los supervivientes se distinguen cambios similares a los observados durante la capacitación espermática, lo que provoca un acortamiento de su período de vida útil. Muchos estudios han investigado el mecanismo por el cual el semen de toro se daña cuando los espermatozoides llegan a 4°C o luego de la congelación. Aunque parece que diferentes partes de los espermatozoides pueden verse afectadas, es la membrana la que parece ser una de las principales causas de muerte celular (Salisbury *et al.*, 1978, Vera, 2001).

La rotura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular. Los daños que pueden producirse en la membrana pueden ser modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica. Las membranas espermáticas que pueden verse afectadas por la criopreservación incluyen la membrana plasmática, la membrana externa del acrosoma y las membranas mitocondriales (Celeghini *et al.*, 2007).

Para evitar o disminuir los daños causados a nivel celular en los espermatozoides se han desarrollado diluyentes, que evitan el deterioro en la membrana espermática y propician la sobrevivencia espermática. Además, los daños ocasionados por este proceso pueden ser reducidos usando crioprotectores como el glicerol, la yema de huevo, lipoproteínas de baja densidad (LDL) extraídas de la yema de huevo y azúcares en los diluyentes. Una nueva generación de diluyentes sintéticos, sin productos de origen animal para su uso con el semen bovino (Biociphos plus™, Bioxcell™, Andromed™) hizo su aparición a mitad de los años 90. La característica principal de los mismos es que emplean un sustituto de la yema de huevo. El objetivo principal de este tipo de producto no ha sido el de mejorar la respuesta a la congelación, sino el de evitar si pudiera darse el caso de una contaminación bacteriológica del diluyente, por intermedio de la yema de huevo. El rol de la yema de huevo durante la congelación es la de proteger los espermatozoides del efecto dañino de la dilución, así como del choque por frío (cold shock) que ocurre durante el proceso de congelación-descongelación, además que desempeña un papel crioprotector (Moussa *et al.*, 2002).

Numerosos autores han demostrado que la fracción de lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo conocida como LDL interacciona con la membrana de

los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación y es la responsable de la protección durante la dilución y la crioconservación (Pace *et al.*, 1974). Un nuevo método de extracción del LDL fue desarrollado en el INRA de Rennes (Francia) y experimentado en semen bovino con excelentes resultados (Amirat *et al.*, 2004). El LDL así extraído ha sido empleado como fuente de lipoproteínas en diluyentes comerciales a base de Tris, ácido cítrico y fructosa y ha permitido confirmar el rol crioprotector de esta molécula así como la concentración óptima en los diluyentes de semen bovino (Amirat *et al.*, 2004; Vera *et al.*, 2009). De esta manera, se elimina el riesgo sanitario de utilizar yema de huevo entera; además, que se mejora el ambiente de incubación del semen cuando se va a congelar.

La dilución del semen una vez recolectado hasta una concentración determinada y para su posterior enfriamiento a 5°C, es una práctica habitual. Por lo general, se diluye la muestra de semen a 30×10^6 espermatozoides/dosis, cuando la pajuela (dosis) es de 0,5 mL y a 20×10^6 esp/dosis, cuando la pajuela es de 0,25 mL. Es muy común que se coloque el doble de la cantidad total de espermatozoides que se necesita para la inseminación, ya que se supone que la congelación afectará la viabilidad en el 50% de los espermatozoides; de esa forma, habrá suficiente cantidad de espermatozoides restantes para la inseminación (Salisbury *et al.*, 1978). Se ha demostrado que a concentraciones espermáticas más bajas de las indicadas, se sucede una disminución de la movilidad individual post-congelación. Esto es debido a que existen factores presentes en el plasma seminal que ayudarían a la conservación de la viabilidad de los espermatozoides; a mayores diluciones se perderían esas propiedades (Vera *et al.*, 2009).

CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL SEMEN FRESCO

Como norma, cuando se adquieren animales o ingresa un reproductor a un CIA, se requiere por obligación aislarlos durante un período de cuarentena. Los controles que se realizan durante ese período tienen por objeto determinar si los sementales están libres de Brucelosis, Tuberculosis, Leptospirosis, Campilobacteriosis genital bovina y Trichomoniasis, entre otras.

Microorganismos asociados con la transmisión por semen

Como ya se mencionó es importante tomar en cuenta que existen microorganismos patógenos que se encuentran en el semen y pueden transmitir enfermedades a todo el rebaño cuando se utiliza para la IA. Es de especial interés, diagnosticar aquellos que no muestran signos clínicos, porque son silentes y pasan desapercibidos, estableciéndose en los órganos genitales, ocasionando a largo plazo procesos inflamatorios infecciosos, difíciles de erradicar. A continuación se señalan los agentes infecciosos que se encuentran en el semen y que deberían ser diagnosticados para mantener la salud reproductiva del rebaño.

Rinotraqueítis infecciosa bovina (BHV-1). Este virus replica en la mucosa del prepucio, pene y parte distal de la uretra. El virus puede estar presente en el semen, sin que el animal manifieste signos clínicos. El diagnóstico de rutina para análisis del semen se realiza en cultivos celulares de origen bovino, siendo conveniente usar sólo toros seronegativos.

Brucelosis. Las brucelas en toros pueden localizarse en las vesículas seminales, ampollas, testículos y epidídimo. Para el diagnóstico, se utilizan pruebas de aglutinación, en especial, en los reproductores que provienen de áreas de riesgo.

Enfermedad de las mucosas o Diarrea viral bovina. El virus es excretado en el semen en la fase aguda. El mejor método para identificar reproductores persistentemente infectados es el examen virológico.

Leptospirosis. En bovinos produce infertilidad, aborto temprano y tardío. Las serovar hardjo han sido aisladas de vesículas seminales, epidídimo y testículos de animales infectados. La prueba de diagnóstico de *Leptospiras* es la microaglutinación, aunque se están desarrollando pruebas moleculares para su detección e identificación.

Campilobacteriosis genital bovina. El toro es portador asintomático de la enfermedad y no presenta modificaciones en las características del semen. La incidencia en los toros aumenta con la edad. Se localiza en la mucosa prepucial y en la mucosa del glande, pudiendo ser transmitido a la hembra a través del servicio natural o artificial. El diagnóstico de rutina es por inmunofluorescencia directa del esmegma prepucial en la cuarentena. Deben realizarse controles semestrales.

Trichomoniasis. El toro es un portador asintomático de la enfermedad. El parásito puede sobrevivir en semen fresco y congelado. El diagnóstico de rutina se realiza cultivando esmegma prepucial. También en este caso se deben realizar controles semestrales.

Chlamydia psittaci. En toros produce principalmente vesiculitis. Se ha observado la excreción de *Chlamydia* en semen de toros con piospermia, asociado con un alto porcentaje de espermatozoides con morfología anormal, aunque diversos autores han detectado presencia de *Chlamydia* en semen de buena calidad. En la actualidad, se ofrecen técnicas de diagnóstico inmunoenzimático y PCR para identificación de *Chlamydia psittaci*.

Es indispensable mantener registros actualizados y confiables que contribuyan a tratar a tiempo o prevenir las enfermedades infecciosas. Por otra parte, debe existir una política de evaluación microbiológica que se aplique antes de comenzar la colección de semen y los programas de inseminación. No hay ninguna necesidad de esperar a que los resultados, muestren que la calidad seminal y la fertilidad son deficientes para decidirse a realizar las evaluaciones e incluso, para recién solicitar los diagnósticos microbiológicos del semen, lo que atrasaría la aplicación de los correctivos y tratamientos, cuando ya es demasiado tarde. Se trata de un plan inteligente de costos-beneficios, pues de nada sirve economizar en salud y multiplicar los gastos en tratamientos.

CONCLUSIÓN

Cuando se analiza la congelabilidad del semen de un toro se pone en evidencia un conjunto de factores ajenos al toro mismo. Sin embargo, para un CIA con un número importante de toros en producción y practicando el mismo manejo de los eyaculados (dilución, enfriamiento progresivo, equilibración y congelación), es posible identificar que el factor calidad del eyaculado pesa de forma preponderante en el resultado final obtenido. De ahí la importancia de tener en cuenta, el adecuado manejo del semental, mejorar la composición de los diluyentes para congelar semen y llevar

un control microbiológico del semen fresco lo cual favorecerá un incremento de la congelabilidad, para de esa manera mejorar los resultados de la IA en la ganadería de doble propósito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61: 895-907.
- Amman RP, Almquist JP. 1961. Reproductiion capacity of dairy bulls. V. Detection of testicular deficiencies and requirements for experimentally evaluating testis function from semen characteristics. *J Dairy Sci* 12: 2283.
- Cardellino R, Hoffmann I, Tempelman KA. 2003. First Report on the State of the World's Animal Genetic Resources: views on biotechnology as expressed in country reports. In: Proc FAO/IAEA international symposium on the applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. pp. 12-14. Vienna, Austria. October 2003.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. 2007. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci* 100:1-13.
- Decuadro-Hansen, G. 1997. Apuntes del curso de Evaluación y Congelación de Semen Bovino. Centro de Inseminación Artificial. CLIA S.A. 1 y 2 de mayo. Entreríos, Argentina 1-25 pp.
- Decuadro-Hansen G, Camus A, Delhomme G, Dumont P, Marquant-Le Guienne M, Rouxel M, Lebreton M. 2000. Can good fertility be achieved with low concentration bull sperm frozen with egg yolk free extender? *Intern Conf Anim Reprod (ICAR)*. Stockholm. July 2000. Abstract. 2: 82.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
- Pace MM, Graham EF. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 39: 1144-1149.
- Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR. 1978. Principios y técnicas de la congelación de los espermatozoides. En: *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España 831 pp.
- Schenck NAAB. 1998. Quality and quantity of bovine spermatozoa from first and second ejaculates: Effects of collection interval and ejaculation frequency. In: 17th Tech. Conf. AI and Reprod. Madison, WI, USA. Sept 1998. pp 59-62.
- Vera O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción Bovina*. C González-Stagnaro (ed). Fundación GIRARZ. Maracaibo-Venezuela. Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo, Venezuela. XV: 249-262.
- Vera O, Muñoz M. 2002. Predicción del potencial fértil del semen bovino mediante pruebas in vitro de la capacidad funcional espermática. En: *Avances en la ganadería de Doble Propósito*. C González-Stagnaro, E Soto Belloso, L Ramirez Iglesia (eds). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data SA. Maracaibo, Venezuela. XXXV: 557-575.

Vera O, Bastidas P, Silva O. 1998. Variación de la calidad seminal bajo diferentes regímenes de recolección de semen en toros Brahman. XLVIII Convención Anual AsoVAC/9 al 14 de Noviembre. Maracaibo, Venezuela.

Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Díaz T, Vásquez BL, Schmidt E, Desherces S, Anton M, Bencharif D, Tainturier D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl and Bioxcell. *Theriogenology* 71: 895-900.