Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes

Previo a describir los pasos para una correcta evaluación seminal, se debe tener en cuenta que existen dos tipos de evaluaciones diferentes, la del semen fresco y la del semen congelado-descongelado. Primeramente se describirán los pasos a seguir para realizar la evaluación del semen fresco que es uno de los pasos en la determinación de la aptitud reproductiva del toro.

Evaluación de semen fresco

Para considerar a un toro como apto reproductivo, asumiendo que es un animal clínicamente sano, debe cumplir con tres requisitos básicos, como son: a) buena libido, b) buen estado clínico reproductivo y c) buena calidad espermática. La evaluación del semen es un punto importante para la certificación de la aptitud reproductiva en un toro.

El semen se puede obtener por medio de electro-eyaculación o vagina artificial y es recolectado en un tubo graduado de 15ml aproximadamente, ya sea plástico o de vidrio, para facilitar la medición del volumen. Se debe tener en cuenta de cubrir el tubo con un protector para evitar que, tanto los rayos UV como los cambios bruscos de temperatura afecten al semen.

Nota: Previo a la llegada del semen al laboratorio se deben tener preparados los siguientes elementos: Baño María conectado y atemperado, ya que tarda unos minutos en estabilizar la temperatura requerida (32-35ºC), colocar dentro del Baño tubos con citrato de Na y la tinción de eosina. Conectar la platina térmica del microscopio y colocar sobre ella los portaobjetos necesarios para realizar la evaluación y los extendidos. Se recomienda realizar 2 extendidos por muestra y tenerlos previamente rotulados con el nombre del animal y la fecha. Preparar el material de laboratorio sobre la mesada en forma ordenada y tener siempre a mano la planilla de evaluación para no olvidar ningún paso.

Una vez que el semen llega al laboratorio, se debe colocar en el Baño María a una temperatura de entre 32 y 35ºC.para comenzar con su evaluación.

La primera evaluación a realizar es la **MACROSCÓPICA**, que consta de los siguientes pasos:

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 4ml. El volumen puede variar entre 2 y 12ml.

Color: se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso.

Densidad: la densidad del semen varía desde un semen acuoso, lechoso, lechoso-cremoso, hasta un cremoso, estando directamente relacionada con la concentración.

Med. Vet. Gómez Ma. Verano, Migliorisi A. Lorena
Cátedra Reproducción Animal
Facultad de Cs. Veterinarias - UNLP

MB = Cremoso, espeso 750.000 esp/mm^3
B = lechoso, 400 a 750.000 esp/mm^3
R = leche aguachenta, 250 a 400.000 esp/mm^3
P = traslucido, menos de 250.000 esp/mm^3

M.M.Ma (Motilidad en Masa Macroscópica): se evalúa observando el tubo de recolección y detectando la presencia o no de movimiento masal o de remolinos. Se considera como positiva o negativa.

Ph: se evalúa extrayendo una gota de semen del tubo y colocándola sobre una tira indicadora de pH. Se considera un pH normal, entre 6.2 y 6.8. **Nota**: **no** introducir la tira dentro del tubo para no alterar el semen con el reactivo de la misma.

Cuerpos Extraños: se evalúa observando el fondo del tubo para detectar la presencia de algún cuerpo extraño, se considera como positivo o negativo.

Schalm Test: se realiza para detectar la presencia de leucocitos, pero sólo en casos que se sospeche la presencia de los mismos. No se hace de rutina en cada evaluación.

Finalizada la evaluación macroscópica, se continúa con la evaluación **MICROSCÓPICA**, que consta de los siguientes pasos:

M.M.Mi (Motilidad en Masa Microscópica): se coloca una gota del semen puro sobre un portaobjetos atemperado a 36-37ºC, sobre una platina térmica de microscopio, y se lo observa a 40 aumentos (lupa), evaluando la presencia de ondas omega. Se debe evaluar cerca del borde de la gota, donde la profundidad de la misma es menor y es más fácil de observar. La escala que se toma es de 1 a 5, evaluando como 1 al semen que no presenta ondas y 5 cuando las ondas se mueven rápidamente formado remolinos. Dentro de esos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo de aceptación 3 de MMMi.

M.I. (Motilidad individual): para realizar esta evaluación se debe diluir el semen en Citrato de Na 2.92% (ver preparación en el apéndice). Se coloca una gota gruesa de semen, de aproximadamente 30 ó 40 microlitros en un tubo con unos 2ml. de la solución de Citrato que debe estar a la misma temperatura del semen, ya en el Baño María. Una vez diluido el semen se extrae una gota de la dilución y se la coloca sobre un portaobjetos atemperado a 36-37ºC y se coloca sobre ésta un cubreobjetos, también a la misma temperatura. Se observa al microscopio, siempre sobre la platina térmica, a 400 aumentos. Se debe observar un campo y valorar subjetivamente los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación. Los espermatozoides que giran en círculo o avanzan en forma oscilatoria, .se consideran que tienen movimientos anormales. El porcentaje que se indica es el de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo del total de espermatozoides aceptados, siendo el valor mínimo aceptable del 50 %.

MB = 80-100% de células móviles.
B = 60-79%
R = 40-59%
P = menos de 40%

Vigor: se evalúa el vigor, al mismo tiempo que la MI, teniendo en cuenta la velocidad con la que éstos espermatozoides atraviesan el campo. La escala que se utiliza es de 0 a 4, evaluando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 4 los que avanzan

rápidamente por el campo y son difíciles de seguir visualmente. Dentro de estos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo aceptable un vigor de 3.

Concentración: para evaluar la concentración, se debe preparar previamente una solución salina formolada 2%(ver preparación en el apéndice). Se colocan 10 microlitros de semen puro en 2ml. de solución salina formolada (1/200) y se homogeniza invirtiendo el tubo varias veces. Una vez homogeneizado, se toman aproximadamente 14 microlitros y se carga la Cámara de Newbawer por capilaridad, en ambos retículos, teniendo en cuenta de cargar otros 14 microlitros para el segundo retículo volviendo a homogeneizar entre una carga y otra. **Nota I:** para preparar la Cámara, se deben humedecer los bordes de ésta antes de colocar el cubrecámara y luego se debe presionar ejerciendo una leve fricción para que el cubrecámara quede fijo y al invertir la Cámara no se caiga. Una vez cargada, se debe dejar reposar unos minutos para permitir que todos los espermatozoides decanten y se ubiquen en un mismo plano para poder contarlos. Luego se procede a ubicar el retículo de glóbulos rojos a 100 aumentos, y una vez localizado, se pasa a 400 aumentos para realizar el conteo. Se cuentan todos los espermatozoides que se encuentren en las 4 cuadrículas de las puntas y la central (5 en total) teniendo en cuenta de incluir también los espermatozoides que se encuentren sobre 2 de las triples líneas de cada cuadrícula, ya sean la superior y derecha ó la izquierda e inferior. Se cuentan los retículos de ambos lados de la cámara y se saca el promedio. Al número de espermatozoides que conté, lo multiplico por 10.000(*) y así obtengo la cantidad de espermatozoides por milímetro cúbico de semen. Se considera como valor aceptable, una concentración de no menos de 750.000 espermatozoides por milímetro cúbico para aceptar el eyaculado para congelación. La concentración mínima aceptable para toro de rodeo general es de 500.000 espermatozoides por milímetro cúbico. **Nota II**: la medición de la concentración se puede realizar al final de toda la evaluación, ya que el semen se puede conservar hasta el otro día en la solución formolada.

(*)Factor de corrección que obtengo de multiplicar la inversa de la dilución por la inversa de la profundidad de la cámara por el total de cuadrículas pequeñas que posee el retículo, dividido el número de cuadrículas pequeñas que cuento en las 5 cuadrículas grandes.

10 x 200 x 400 / 80 = 10000

Frotis: para completar la evaluación se deben realizar los siguientes frotis:

Coloración Vital, Morfología y Acrosomía, pudiéndose evaluar éstos dos últimos en el mismo frotis, con la tinción adecuada.

a) Coloración Vital: se realiza extrayendo una gota de aproximadamente 10 microlitros de semen puro y colocándola sobre la punta de un portaobjetos limpio y desengrasado atemperado a 36,-37ºC sobre la platina térmica. Sobre esta gota se coloca una gota de aproximadamente 30 microlitros de eosina, que debe estar a la misma temperatura del semen, en un tubo dentro del Baño María. Se mezcla suavemente con la punta de la pipeta por aproximadamente 20 segundos. Se utiliza otro portaobjetos, también atemperado, y se apoya sobre el borde de la gota para que por capilaridad se distribuya sobre el portaobjetos, se levanta y se realiza el extendido en forma firme. (**Nota I**: no se realiza el extendido directamente de la gota gruesa dónde se mezcló para evitar que el frotis tenga un grosor excesivo y resulte dificultosa su lectura). Se deja secar sobre la platina térmica y se procede a su lectura. El fundamento de esta técnica es el siguiente: el colorante penetra la

membrana de los espermatozoides muertos, dejando sin teñir los que se encontraban vivos al momento de realizar la tinción. Para sacar el porcentaje de espermatozoides vivos se procede a observar el frotis a 400 aumentos, contando en guarda griega todos los espermatozoides de cada campo evaluado, discriminando los que están teñidos, como muertos y los sin teñir como vivos. Se cuentan no menos de 100 células y se saca el porcentaje. Se considera como valor mínimo aceptable, el 70 % de espermatozoides vivos. (**Nota II**: la lectura del frotis de coloración vital se debe realizar el mismo día de la evaluación, ya que pasado el tiempo todos los espermatozoides pueden llegar a teñirse).

b) Morfología y Acrosomía: se coloca una gota de aproximadamente 30 microlitros de semen diluido sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se realiza el frotis en forma firme y pareja. Se deja secar el frotis y se lo tiñe con una solución de Giemsa. Se dejan incubar con el colorante por 4 horas, se los retira se enjuagan y se los deja secar. La evaluación de la morfología y la acrosomía se realiza bajo aceite de inmersión a 1000 aumentos. Los espermatozoides se visualizan de color violáceo y en el caso de tener presente su acrosoma se puede apreciar de un violáceo más intenso, de estar ausente el mismo se observa la cabeza del espermatozoide de un color homogéneo o con el tercio superior más claro. El valor mínimo tanto para rodeo general como para congelación es de 70% de acrosomas normales. También se puede evaluar por medio de contraste de fase con glutaraldehído al 0,2%. Si se desea ver sólo morfología se puede utilizar también Rosa de Bengala observándose a los espermatozoides de un color rosa intenso.

Con respecto a las **Malformaciones Espermáticas,** se las puede clasificar siguiendo diferentes criterios:

1) Primarias y Secundarias

Es la clasificación más usada en la bibliografía, pero no por ello la más exacta. Las malformaciones **Primarias** por definición, son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y malformaciones **Secundarias** son aquellas que se originan dentro del epidídimo; cabe destacar que por definición se denota el origen y no la severidad del defecto.

2) Mayores y Menores

Esta clasificación la propuso Bloom en 1977 y llamó malformaciones **Mayores** a aquellas que estaban asociadas con infertilidad y malformaciones **Menores** a aquellas que, al momento de crear el método de clasificación, no se encontraban relacionadas con la fertilidad en forma directa.

3) Compensables y No Compensables

En 1994 Saacke y col. propusieron clasificar los defectos como **Compensables** a aquellos en los que el espermatozoide no llega a la vecindad del ovocito y no evita que otro espermatozoide realice la fertilización; por lo tanto si se aumenta la concentración de la dosis seminal, se podría llegar a compensar este tipo de malformación, tal es el caso de espermatozoides con problemas en el sistema de locomoción. Un defecto **No Compensable** es aquel en el cual el espermatozoide está perfectamente capacitado para llegar hasta el ovocito, realiza el bloqueo de la polispermia pero es incapaz de continuar el proceso de fertilización. Dicho defecto no se puede compensar aumentando la concentración de la dosis inseminante, ya que si una muestra posee un 20% de espermatozoides con este defecto, no habrá ninguna diferencia si hay 100, 1.000 o 10.000 en el oviducto, siempre tendríamos 20% de chances de que un espermatozoide con este tipo de defecto inicie la

reacción acrosómica y bloqueo de la polispermia. Tal es el caso de espermatozoides con vacuolas nucleares (defecto de diadema).

En la actualidad, quizás lo mas adecuado sea identificar cada una de las anormalidades por su ubicación dentro de la estructura del espermatozoide y la relación de cada una de ellas con la fertilidad, para lo cual aún se requieren muchos estudios para poderlo dilucidar fehacientemente en todos los casos. En general el número máximo de anormalidades de cabeza aceptable se encuentra entre un 15 y un 20%. Con respecto a las anormalidades de acrosoma y cola se puede aceptar hasta un 25%. Fuese cual fuese el sistema de clasificación, en ninguno de los casos se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales en el eyaculado para poder aceptar un toro como apto reproductivo en cuanto a su semen, tanto para rodeo general, como para congelar.

Uso	MMMi	MI	Vigor	Concentración (esp/mm^3)	% Esp. Normales	%Vivos	%Acros. Normales
Rodeo general	3	50%	3	500.000	70%	70%	70%
Congelación	4	70%	3	750.000	70%	70%	70%

Evaluación de semen congelado

El semen utilizado para la producción de pajuelas ya tiene su apto reproductivo, por lo tanto la evaluación postdescongelado tiene como finalidad conocer si ese semen fue capaz de superar el proceso de congelación-descongelación. Los factores que pueden afectar los valores de evaluación corresponden a factores intrínsecos del semen, o factores de manejo del mismo (falta de N2 líquido en el termo de almacenamiento, etc.).
La descongelación de la pajuela se realiza a agua a 37ºC durante 1 minuto. Se corta uno de los extremos, se introduce la pajuela en un tubo a igual temperatura dentro del Baño María y se corta el otro extremo. La evaluación consta de los siguientes pasos:

1) **MI**: 0hora y 2horas incubado a 37ºC. A la 0hora valor mínimo 40% y a las 2horas: 30% de espermatozoides mótiles. Según el Departamento de Medicina del Rodeo y Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá y que se corresponden con las normas ISO 9002, los valores son: 0hs de 25% y a las 2hs. de 15%.
2) **Vigor**: 0hora y 2horas incubado a 37ºC. A la 0hora valor mínimo 3 a las 2horas: 2.
3) **Acrosomía**: se realiza con tinción de Giemsa o por contraste de fase con glutaraldehído al 0,2%. 0hora y 2horas incubado a 37ºC. A la 0hora valor mínimo 60% de acrosomas intactos y a las 2horas: 40%.
4) **Morfología**: se realiza igual que el semen fresco con un mínimo de espermatozoides normales del 70%.
5) **Concentración**: la concentración de una pajuela de 0,25ml o 0,5ml varía de 20-30millones de espermatozoides totales por pajuela. De los cuales al descongelado deben existir un mínimo de 10 millones de células mótiles por pajuela. Para ello se realiza una dilución de 1/200 de la pajuela en solución salina formolada y se hace el recuento en la cámara de Newbawer. Luego se multiplica el resultado por 5.000.000 y luego por el %de espermatozoides mótiles obteniéndose el número total de espermatozoides mótiles por dosis.

El semen puede resultar SATISFACTORIO, CUESTIONABLE (1 parámetro se encuentra por debajo del mínimo) o INSATISFACTORIO (mínimo 2 parámetros se encuentran por debajo del mínimo).

Bibliografía

Barth, A. Abnormal morfology of bovine espermatozoa. Iowa St. University Press. 1989.

Curso de Posgrado en Reproducción Bovina. Módulo II Capacidad Reproductiva del toro. IRAC. 2001

Salisbury, G; Van Demark, N; Lodge, J. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. Ed. Freeman. 1978

EVALUACION REPRODUCTIVA DE TORO

Propietario:	Nombre del animal:	Fecha Evaluación:
Dirección:	Nro. Identificación:	Raza:
	Tatuaje: Caravana: Marca	
Teléfono: ( )	Fecha de Nacimiento: Edad:	
	Padre: Madre:	
ANAMNESIS **Individual:** Revisación Previa □ Fecha: _ _ / _ _ / _ _ Clasificación: _____ **Rodeo:**		

Examen Físico	**Examen de semen**		
Condición Corporal (1-5):	Método de recolección: EE □ VA □ Masaje □		
Aparato locomotor:	Rta: Eyaculación □ Protusión □ Erección □		
Ojos:	**Ex. del Eyaculado**	E1	E2
Escroto:	Volumen		
Testículos-Tono:	Color		
Epidídimo/Cordón espermático:	Densidad		
Pene/ Prepucio:	M.M.Mi. (1-5)		
Glándulas Vesiculares:	Mot.Individual (MI)		
Ampolla/Próstata:	Vigor (0-4)		
Anillo Inguinal:	% vivos		
Circunferencia Escrotal: cm	Concentración		
Examen Sanitario:	% Anorm. Primarias		
Bruc: TBC: IBR: DVB:	% Anorm. Secundarias		
Campy: Trico: Lepto:	Observaciones:		
Observaciones:			
	Clasificación: Los datos resultantes del examen indicarían en el día de la fecha que el toro es: Apto No Apto Clasificación diferida Fecha de reexaminación recomendada: Firma		

Med. Vet. Gómez Ma. Verano, Migliorisi A. Lorena
Cátedra Reproducción Animal
Facultad de Cs. Veterinarias - UNLP

Un eyaculado aceptable **para toros de rodeo general** es aquel que posee como valores mínimos:

Motilidad en masa (1-5) = 3
Motilidad individual progresiva rectilínea = 50%
Vigor (0-4) = 3
% de vivos = 70%
% de normales = 70%
Concentración = 500.000 esp/mm^3

CÁTEDRA DE REPRODUCCIÓN ANIMAL
INSTITUTO DE TERIOGENOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNLP

EVALUACIÓN DE SEMEN CONGELADO-DESCONGELADO

Propietario: _____ Fecha: _____
Dirección: _____ Teléfono: _____
Nombre del Toro: _____ Raza: _____ Nº:_____
Fecha de congelado: _____ Diluyente: _____

Congelado como: Pajuela: ☐ Pastilla: ☐ Ampolla: ☐
Tiempo y temperatura de descongelado: _____

VIABILIDAD POST DESCONGELADO

% Motilidad Progresiva: 0hs_____ (Mínimo 40%) 2hs_____ (Mínimo 30%)

Vigor: (0 a 5):0hs._____ (Mínimo 3) 2hs._____ (Mínimo 2)

% de Acrosomas intactos: 0hs._____ (Mínimo 60%) 2hs._____ (Mínimo 40%)

MORFOLOGÍA

Normales: _____ (Mínimo 70 %)

Malformaciones de Cabeza: _____

Cabezas sueltas: _____

Malformaciones de Pieza intermedia: _____

Malformaciones de Cola: _____

Gotas: Proximal: _____ Distal: _____

CONCENTRACIÓN

Total de células por dosis: _____

Células mótiles por dosis: _____(Min. 10 millones)

CONCLUSIONES

SATISFACTORIO CUESTIONABLE NO SATISFACTORIO

Observaciones:_____

_____

Fecha: _____ Firma: _____