



**CENTRO
MEDICO
VETERINARIO
DE COLONIA**

inia

**LA ESTANZUELA
INSTITUTO
NACIONAL DE
INVESTIGACION
AGROPECUARIA**



**COLAVECO
COOPERATIVA
LABORATORIO
VETERINARIO
DE COLONIA**

**LE
612.6
JORp
1997**



**INTENDENCIA
DE COLONIA**

LMC

SECRETARIA DE EXTENSION Y DESARROLLO

JORNADAS DE PATOLOGIA REPRODUCTIVA EN BOVINOS



**25-26 JULIO 1997
HOTEL NIRVANA
COLONIA SUIZA**

EVALUACION DE SEMEN CONGELADO

Métodos, Resultados obtenidos

P. Bañales, DMV y L. Fernández, DMV³

I. INTRODUCCION

Para el éxito de una inseminación artificial debemos, entre otros factores, utilizar semen de buena calidad sanitaria, calidad biológica, calidad bacteriológica y correctamente identificado.

Por calidad sanitaria se entiende que el semen preparado para inseminación artificial debe estar libre de agentes patógenos transmisibles por el semen.

En cuanto a la calidad bacteriológica, debemos resaltar que el semen es el testigo indirecto de la calidad higiénica del establecimiento y del veterinario que congeló esas dosis. El objetivo a alcanzar es que el 95 % de las dosis de cada partida contengan menos de 500 unidades formadoras de colonias (UFC) totales, tal cual lo recomiendan las normas internacionales (ISO y OIE).

La calidad biológica es la que nos da el poder fecundante del semen luego de la descongelación, siendo dependiente del número de espermatozoides con movimiento rectilíneo, del porcentaje de esos espermatozoides en la dosis y de su morfología. Debemos lograr que un número determinado de espermatozoides viables y morfológicamente normales sea depositado en el lugar indicado y en un momento preciso del ciclo estral. Es imprescindible pues lograr una precisa detección de celos, una correcta técnica de inseminación artificial y la utilización de una dosis inseminante de buena calidad.

En el presente trabajo se discutirán algunos métodos utilizados para la evaluación de la calidad biológica y los resultados obtenidos, así como algunos criterios de calidad utilizados por diversos centros.

II. MÉTODOS DE EVALUACION

En lo que respecta a la evaluación de semen congelado se determinarán parámetros cuantitativos (volumen y concentración) y cualitativos (porcentaje de espermatooides vivos y vigor por un lado y porcentaje de espermatooides con anomalías por el otro).

II.a.- PARAMETROS CUANTITATIVOS

II.a.1) VOLUMEN:

El volumen de las pajuelas debe ser entendido como el volumen útil, es decir, el que el inseminador deposita en el útero de la vaca inseminada. Corresponde a una columna líquida de más o menos 10 cm de altura. es decir, el largo de una pajuela, y variará de acuerdo a si es una pajuela de 0.50 ml o 0.25 ml. Según datos no publicados por Malgras y Goffaux del UNCEIA de Francia, en el caso de la pajuela de 0.50 ml o pajuela mediana, el volumen de carga es de 0.52 ml y el volumen útil de 0.49 ml, mientras que para la pajuela de 0.25 ml o mini pajuela, el volumen de carga es de 0.23 ml y el volumen útil 0.21 ml.

En el caso de los minitubos el volumen útil medido por este Depto. oscila entre 0.23 y 0.24 ml.

El volumen de un pellet también es variable por lo que para los estudios de concentración lo recomendable sería utilizar un pellet entero en un volumen conocido de diluyente y no una alícuota.

Este Departamento estima el volumen medio de un pellet en 0.1 ml.

³ Depto. de Reproducción. DILAVE "Miguel C. Rubino"

II.a.2) CONCENTRACION

Si bien lo recomendable sería utilizar dos dosis inseminantes para determinar su concentración, en el caso de las pajuelas medianas y los pellets por lo general este Departamento está utilizando una sola dosis.

Este Departamento realiza el estudio de la concentración mediante un software denominado PERL, a través del cual se ingresan los datos de identificación, volumen útil de la dosis, volumen de la alícuota de semen, volumen del diluyente y porcentaje de espermatozoides viables a la descongelación.

Para el caso de las pajuelas y minitubos se está realizando una dilución de una alícuota en un volumen conocido de solución bufferada formolada, realizando el conteo en una cámara de Thoma Neubauer. El volumen del diluyente es de 2000 μ l (2 ml) y el de la alícuota de 50 μ l.

En el caso de los pellets se coloca un pellet entero en 10000 μ l de solución, ingresando como volumen de la alícuota un estimativo de 100 μ l (0.1 ml)

La dilución es homogeneizada y montada en la cámara, dejando transcurrir un lapso de 5 minutos antes de iniciar el conteo. Se observa en un microscopio de contraste de fases a 500 X. Se cuentan suficientes cuadrados grandes (que a su vez tienen tallados 16 cuadrados pequeños) de modo de contar en total entre 150 y 200 espermatozoides. El número de espermatozoides por cuadrado es ingresado al programa PERL, habiendo un código para espermatozoides normales y otro para anormales. Una vez finalizado el conteo, el programa nos brinda la concentración de espermatozoides en la dosis útil, el total de espermatozoides viables por dosis y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anómalos.

Otra método para calcular la concentración es realizar una dilución de 1:200 de la alícuota, montar la misma en la cámara, contar 10 cuadrados grandes (cinco en cada sector de la cámara) y el resultado obtenido multiplicarlo por 5000, lo que da el total de espermatozoides por mm cúbico, debiendo multiplicarlo por 1000 si se desea tener el resultado por ml.

II.b.- PARAMETROS CUALITATIVOS

II.b.1) PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS VIVOS Y VIGOR

Si bien existen métodos objetivos para la determinación de estos parámetros, hasta el presente los mismos no han llegado a reemplazar los métodos subjetivos como ser la observación del semen descongelado en microscopio de contraste de fases.

Cada centro productor de semen indica una temperatura y tiempo de descongelación como ideal. En condiciones de campo es importante no dejar el semen en el baño por un tiempo excesivo de manera de evitar que el mismo se caliente y luego sufra un shock térmico al retirarlo del baño.

En el Laboratorio estamos utilizando un baño maría a 37 C, dejando las pajuelas medianas y minitubos durante 40 segundos y las pajuelas finas 30 segundos. Una vez descongelado se vacía el contenido de las pajuelas en un tubo de vidrio precalentado, se homogeneiza, se colocan gotas de 10 a 15 μ l en un portaobjeto sobre platina térmica y se las cubre de inmediato con un cubreobjetos de manera de evitar la desecación de las mismas. Se observa en microscopio de contraste de fases. En caso de tratarse de dosis muy concentradas o con diluyentes en base leche, muchas veces se diluye con citrato de sodio (1.40 gr. en 50 ml de agua bidestilada) o suero fisiológico al 7 o/oo.

Si bien al igual que para concentración lo ideal sería descongelar entre 2 y 3 dosis para evaluar la motilidad minimizando el efecto pajuela, el Departamento está utilizando una sola dosis en caso de las pajuelas medianas importadas debido a su valor, colocando siempre de 2 a 3 gotas para minimizar el efecto gota.

Para el estudio de espermatozoides reanimados y el vigor de los mismos, se utiliza una clasificación subjetiva. Los espermatozoides reanimados se expresan como porcentaje y el vigor se expresa en una escala que va del 0 al 5.

- 0: sin movimiento**
- 1: movimientos en el lugar**
- 2: motilidad progresiva lenta**
- 3: motilidad progresiva rápida**
- 4: motilidad progresiva muy rápida**
- 5: motilidad progresiva muy rápida con vibración de la cabeza**

El estudio de la motilidad incluye un test de termoresistencia (TTR). Consiste en colocar el semen a determinada temperatura e ir realizando evaluaciones a medida que transcurre el tiempo. Existen muchas variaciones de este test, tanto en lo referente a temperatura (de 25 a 39 C), tipo de baño maría (con o sin agua circulante), tiempos de evaluación, en tubo o directamente en la pajueta, a la oscuridad o con luz y tubo tapado o sin tapar.

No existe un lenguaje común respecto a TTR a nivel mundial, lo que lo vuelve poco comparable. Asimismo hay variación con respecto a los diluyentes y es así que por ejemplo con diluyentes en base de TRIS el semen de un mismo eyaculado se comporta mejor que con diluyentes citratados.

En el Departamento estamos utilizando un baño seco a 35 en el cual se colocan los tubos sin tapar, evaluándolos a las 2 horas. Hasta hace dos años se realizaban evaluaciones sucesivas a los 60, 120 y 180 minutos post descongelado pero actualmente se realiza solamente una evaluación a los 120 minutos según lo recomendado por la Society for Theriogenology de los EEUU.

II.b.2) MORFOLOGIA

Se realiza con el semen diluido en formol bufferado o citratado, colocando una gota muy chiquita de manera que quede bien aplastada (conviene usar un cubreobjetos grande) y con microscopio de contraste de fases se cuentan al menos 200 espermatozoides a por lo menos 500 X.

Para el estudio de anomalías se está utilizando el ya mencionado programa PERL, el cual calcula las anomalías individuales, el total de espermatozoides con anomalías mayores y el total de espermatozoides con anomalías. La clasificación de las anomalías es la de Blom y Ott modificada por Dumont (figura 1).

Con contraste de fases muchas veces se dificulta la visualización de los defectos de acrosoma como ser cráteres y acrosoma en botón así como algunos pliegues de la cabeza. Este Departamento espera contar pronto con un microscopio con contraste diferencial de interferencia (Nomarski) de manera de lograr un estudio completo de la morfología espermática.

En caso de observarse porcentajes elevados de espermatozoides anómalos se realiza tinción de Williams aunque normalmente los resultados observados no difieren con los obtenidos por contraste de fases. Asimismo, en caso de presencia de células extrañas se realizan tinciones con hematoxilina eosina, Giemsa o coloración de Galloway (Azul de metileno y Fucsina básica) para su estudio y clasificación.

III) PARAMETROS MINIMOS RECOMENDADOS

Existen numerosas escuelas que preconizan diferentes parámetros mínimos. Si bien de algunos toros se conocen test de fertilidad que avalan la utilización de semen congelado de los mismos que no cumplen alguno de esos parámetros mínimos, es necesario considerar que normalmente las inseminaciones artificiales para la determinación de esa fertilidad son realizadas en condiciones ideales, cosa que no siempre ocurre en nuestros establecimientos. Siempre es necesario fijar parámetros mínimos de aceptabilidad para la generalidad de los casos.

Es así que la Society for Theriogenology de los Estados Unidos, recomienda que una dosis inseminante contenga al menos 10 millones de espermatozoides morfológicamente normales con 50 % de ellos con movimiento rectilíneo uniforme, lo que nos da un mínimo de 5 millones de espermatozoides viables morfológicamente normales por dosis, con hasta 30 % de anomalías.

Por otra parte el UNCEIA de Francia recomienda un mínimo de 8 millones de espermatozoides viables por dosis, 30 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme, menos de 25 % de anomalías totales y menos del 15 % de anomalías mayores.

La escuela sueca preconiza la utilización de parámetros aún más exigentes.

Este Departamento propone un mínimo de 6 millones de espermatozoides viables morfológicamente normales por dosis, 35 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme y menos de 30 % de anomalías totales con no más de 15 % de anomalías mayores.

Las partidas se califican, en base a estos parámetros, como aptas, cuestionables y no aptas. La calificación de apta indica que la partida cumple con los requisitos mínimos en todos sus aspectos; este semen proporcionará buenas tasas de concepción siempre y cuando sea utilizado correctamente. La calificación de cuestionable no indica que la partida sea descartable sino que la misma se aparta ligeramente de los parámetros estándar por lo que estas partidas deberían ser utilizadas con precaución y cabe esperar reducciones de la tasa de concepción. La calificación de no apta indica que la calidad del semen se encuentra marcadamente por debajo de los mínimos estándar en una o más características; cabe esperar bajas tasas de concepción. Esta categorización es la misma que se utiliza en los Estados Unidos (satisfactory, questionable y unsatisfactory).

IV. RESULTADOS OBTENIDOS

Hay que destacar que los resultados presentados son producto de las evaluaciones solicitadas a este Departamento y no de un muestreo estadístico. Muchas veces las materiales son remitidos frente a casos problema. Asimismo el resultado muchas veces es reflejo de condiciones defectuosas de manejo del semen congelado y no de la calidad del semen inmediatamente de congelado.

En los últimos años se ha evaluado gran parte de las partidas de semen importado a solicitud de la CONAPROLE y algunas firmas importadoras y distribuidoras. En lo que refiere al semen nacional esto no es así y la mayoría de las veces es frente a casos problema.

En el caso de las partidas de semen importado, su calidad no ha variado sustancialmente en el curso de estos últimos años. Si lo ha hecho la calidad del semen nacional, donde se constata un incremento notorio de su calidad y una evolución hacia la congelación en pajuelas durante el mismo período.

El estudio detallado y clasificación de las anomalías morfológicas, se realiza sólo en aquellos casos en que se detecta un porcentaje alto de las mismas al realizar el estudio de concentración. Es por ese motivo que en el cuadro anterior no se presenta el detalle de las anomalías encontradas dado que se realizó ese estudio en pocos casos y no en total de las muestras procesadas

El resumen de los resultados obtenidos de los materiales procesados en los últimos años y expresado en porcentajes, es el que sigue:

	1995	1996	1997 (a mayo)
Semen nacional	n=81*	n=97	n=48
APTO	55	66	67
CUESTIONABLE	10	11	15
NO APTO	35	23	18
Semen importado	n=160*	n=139	n=44
APTO	98	89	89
CUESTIONABLE	1	11	11
NO APTO	1	0	0

*: los valores del año 1995 solo corresponden a resultados por reviviscencia y termoresistencia

A continuación se presentan los valores promedio de algunos de los parámetros estudiados, valores calculados para un total de 176 materiales procesados en los 9 meses comprendidos entre octubre/96 a junio/97:

	SEMEN IMPORTADO	SEMEN NACIONAL
Muestras procesadas	127	49
Spz móviles reviviscencia	53.3 %	33.3 %
Vigor a la reviviscencia	3.8	3.5
Spz. móviles 120 minutos	32 %	23 %
Vigor a los 120 minutos	3.0	2.6
Total Spz. con anomalías	10.6 %	14.9 %
Millones Spz. / dosis	21.91	44.08
Millones Spz. viables / dosis	11.59	14.17

Acá cabe hacer una salvedad. El estudio detallado de la morfología espermática ofrece dificultades cuando se trata de semen congelado por varios motivos. El proceso de congelación/descongelación puede

desprender gotas citoplasmáticas, pueden producirse colas dobladas por shock térmico y es bastante engorroso realizar buenas tinciones de las células espermáticas dado que interfieren los distintos componentes de los diluyentes. Es por estos motivos que aspiramos contar a la brevedad con un moderno microscopio con contraste de fases y contraste diferencial de interferencia (DIC) que permita un más detallado estudio morfológico de la célula espermática sin crear artificios de técnica.

En lo que refiere al estudio de morfología espermática y por lo expresado anteriormente, lo recomendable es realizar un espermiograma completo del semen fresco del toro previamente a proceder a su congelación. En las muestras procesadas hemos encontrado en algunos casos material seminal con un muy alto porcentaje de anomalías totales y anomalías mayores por lo que no debería haberse realizado la congelación del mismo.

Aunque no corresponde al tema de evaluación de semen congelado, se presentan a continuación los promedios de las anomalías encontradas en evaluaciones de toros de campo efectuadas por este Departamento, en el periodo 1993 / 1995, correspondientes a 515 toros. En el cuadro que sigue se utiliza la clasificación de Blom y Ott modificada por Dumont y la presentación corresponde a la ofrecida por el ya mencionado programa PERL.

 Porcentaje medio de anomalías espermáticas encontradas en 515 toros de campo.-

Tipo de anomalía	Porcentaje de anomalías
0: Gota citoplasmática proximal	1.0
1: Cabezas piriformes	
Crestas nucleares	
Cabezas replegadas	2.3
2: Colas fuertemente dobladas	
Colas enrolladas en la base	
Colas alrededor de la cabeza	1.7
3: Deformaciones de la pieza media	0.2
4: Formas inmaduras	
Formas dobles	0.4
5: Cráteres	--
6: Acrosoma en botón	0.1
7: ESPERMATOZOIDES CON ANOMALIAS MAYORES:	5.4
8: Gota citoplasmática distal:	0.8
9: Cabezas sueltas normales:	3.4
10: Colas dobladas simples	
Colas de mico	3.1
11: Cabezas estrechas, pequeñas o gigantes	0.4
12: Implantación abaxial	0.1
13: Acrosomas defectuosos o desprendidos	0.1
14: Colas quebradas o cortadas	0.2
15: Otras anomalías menores	--
16: TOTAL ESPERMATOZOIDES CON ANOMALIAS	12.9

V.- CONCLUSIONES

Creemos que aún debe trabajarse mucho en lo que refiere a calidad del semen congelado de origen nacional. No solo deben tenerse en cuenta los aspectos de calidad biológica tratados en el presente trabajo sino también los aspectos sanitarios, bacteriológicos y de identificación, tal cual se mencionara en la introducción.

En lo que respecta a estos últimos aspectos, debemos asegurarnos de que al utilizar semen congelado no estamos difundiendo una enfermedad. En este sentido en la DILAVE ha podido observarse la presencia de *Campylobacter* spp. en semen congelado mediante la técnica de inmunofluorescencia directa. La profesión debe tomar conciencia de este problema y realizar las pruebas diagnósticas necesarias antes de proceder a la comercialización del semen congelado. Si bien es un aspecto reglamentario que este Departamento intenta controlar, también configura un aspecto ético que todos deberíamos mantener presente.

Muchas veces se descuidan los aspectos de calidad bacteriológica y de identificación. Aunque parezca un aspecto de menor importancia, podemos estar induciendo infecciones uterinas inespecíficas por utilización de semen de mala calidad bacteriológica o por descuidos en la higiene de la inseminación en sí. Asimismo se ha constatado en algunos casos la utilización de semen de un reproductor no deseado por no tener las dosis correctamente identificadas, hecho que se acentúa con la utilización de pellets. La identificación debe incluir no sólo los datos del reproductor sino también información sobre la fecha de colecta o partida de semen.

VII.- BIBLIOGRAFIA

1. BARTH, A.D. Y OKO, R.J. *Abnormal Morphology Of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press / Ames 1989
2. BARTH, A.D. *Frozen Semen Evaluation*. International Workshop On Advanced Reproductive Technologies. University Of Saskatchewan, Sasjatoon, Canada. May 1993
3. BLOM, E. *The Ultrastructure Of Some Characteristic Sperm Defects And A Proposal For A New Classification Of The Bull Spermogram*. Nord. -Vet.Med., 25:383-391 1973
4. CIPTADI, G.; DUMONT, P.; THIBIER, M. *Evaluation De La Technique D'examen Des Anomalies Morphologiques Des Taureaux Sur Frottis Comparé Aux Techniques En Phase Liquide*. Elevage Et Insemination. 257. 1993.
5. CHENOWETH, P. J.; BALL, L 1980 *Breeding Soundness Evaluation In Bulls Current Therapy*. In Theriogenology I. Morröw.
6. FACHE, M.; GUERIN, B.; PAREZ, M.; THIBIER, M. 1985. *Etude Quantitative De La Flore Bactérienne Non Pathogene Dans Le Sperme Et La Semence De Taureau*. Elevage Et Insemination. 207.
7. GOFFAUX, 1991. M. *L'examen Approfondi Des Anomalies Morphologiques De La Semence Du Taureau*. UNCEIA - Journée Technique, Paris, Avril
8. GOFFAUX, M. 1991. *Enquetes Sur La Qualité De La Semence Congelée: Méthodes, Tendances Générales, Normalization Et Variabilité*. UNCEIA - Journée Technique, Paris, Avril.
9. GUERIN, B. Y THIBIER, M. *La Qualité Microbiologique De La Semence Congelée*. UNCEIA - Journée Technique. Paris, Avril 1001.
10. HARASYMOWYSZ, J.; BALL, L Y SEIDEL, G. *Evaluation Of Bovine Spermatozoal Morphologic Features After Staining Or Fixation*. Am.J.Vet.Res. 37:9, 1976
11. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION (I.S.O.) 1976. *Frozen Semen Of Breeding Bulls*. The Fifth Draft. ISO Proposal..
12. JANUSKAUSKAS, A.; SODERQUIST, L.; HAARD, M.; HAARD, M. Ch.; LUNDEHEIM, N. Y RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1995. *Influence Of Sperm Number Per Straw On The Post Thaw*

Sperm Viability And Fertility Of Swedish Red And White AI Bulls. On Studies On The Assesment Of Post Thaw Sperm Viability Of Swedish Dairy AI Bulls. Swedish University Of Agricultural Sciences. Uppsala.

14. LECHAT, M. Y GUERIN, B. 1991. Effets De L'application Des Regles De Hygiene A La Collecte Sur La Qualité Bacteriologique De La Semence Du Taureau. UNCEIA - Journée Technique. Paris - Avril.
15. MICKELSEN, D.; MEMON, M. 1993. Relationship Of Post Thaw Semen Evaluation To Pregnancy Rates In Beef Bulls. Agri Practice, Vol. 14, N°5,
16. OTT, R. Breeding Soundness Examination Of Bulls. 1986. Current Therapy In Theriogenology II. Morrow.
17. PAREZ, M. 1984. The Most Important Genital Diseases Of Cattle, Control, Treatment And Hygiene Of Semen Collection. In: 11th Confer. Of The O.I.E. Region Commission For Europe. Vienne,
18. SEKONI, V.; GUSTAFSSON, B.; MATHER, E. 1981. Influence Of Wet Fixation, Staining Techniques And Storage Time On Bull Sperm Morphology. Nord. Vet. Med., 33, 161-166.
19. SULLIVAN, J. 1970. Sperm Numbers Requiered For Optimun Breeding Efficiency In Cattle. Proc. 3rd. Tech. Conf. Artif. Insem. And Reprod. NAAB,