

## FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD SEMINAL EN TOROS

Lozano H<sup>1</sup>

Clínica de la Reproducción  
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Sede Bogotá  
Universidad Nacional de Colombia

### RESUMEN

La calidad seminal de los toros se puede ver afectada por múltiples causas tanto de origen infeccioso o no infeccioso. El entendimiento adecuado de estas causas es de gran importancia ya que de este modo se pueden tomar los correctivos necesarios ya sea para tratar al toro, o en otros casos para descartarlo del sistema productivo del cual haga parte. No se debe olvidar como la presencia física del toro se puede dar a partir de un banco de germoplasma (semen congelado), el cual puede tener problemas de calidad no inherentes al proceso de criopreservación sino a factores infecciosos o no infecciosos previos a la congelación. Los problemas de calidad seminal se verán reflejados en los diferentes parámetros reproductivos del sistema productivo, lo que a su vez será de gran relevancia al hacer un balance de pérdidas y ganancias de una ganadería tanto de ganado de carne como de leche.

**Palabras clave:** Semen, infecciosos, criopreservación, germoplasma.

## FACTORS AFFECTING SEMINAL QUALITY IN BULLS

### ABSTRACT

Semen quality of bulls can be affected by multiple causes, both infectious and non infectious. Proper understanding of these causes is imperative, either to take the necessary correctives to treat the bull or to discard it from the productive system. It is important not to forget that the physical presence of the bull can be from a germoplasm bank (frozen semen) which can have quality problems not related to the cryopreservation procedure but to infectious or not infectious factors before freezing. Seminal quality problems will be reflected on different reproductive parameters of the productive system and these will be highly relevant when estimating earnings and losses of the productive system, both for beef or milk production.

**Key words:** Infectious, semen, cryopreservation, germoplasm.

<sup>1</sup> hlozanoma@unal.edu.co

## INTRODUCCIÓN

Los factores que pueden llegar a afectar la calidad seminal en toros son variados; se debe tener en cuenta que estos pueden afectar el plasma seminal y/o los espermatozoides.

El momento en que la afección sobre la calidad seminal se presenta puede ser de gran orientación para entender qué ocurre, qué consecuencias en el estatus reproductivo del toro se pueden llegar a presentar, y si la tiene, cuál sería la solución.

Es importante, por tanto, recordar cómo se forman los espermatozoides (espermatogenesis) una vez se inicia la pubertad, al igual que algunos de los mecanismos de protección que tanto los espermatozoides como el plasma seminal poseen para que la calidad no se vea afectada en el toro ya sea por monta directa o a través de alguna biotecnología reproductiva.

La calidad del semen criopreservado se puede ver afectada en una mayor forma que el semen fresco, y aún mucho más cuando este semen es requerido para tecnologías como la fertilización *in vitro* e inyección intracitoplasmática (ICSI), entre otras.

Los factores que pueden afectar la calidad seminal son tanto infecciosos como no infecciosos, y en esta forma se presentarán en este documento.

## ESPERMATOGENESIS

Consiste en el conjunto de eventos que se llevan a cabo en el estroma testicular a nivel de los túbulos seminíferos, y que se inicia con la pubertad del toro, dando lugar a la producción de espermatozoides a partir de células primordiales, con base en un control de tipo endocrino, paracrino y auto-crino (1, 2, 3).

### CONTROL ENDOCRINO

El periodo previo a la pubertad, donde comienza la espermatogenesis, se caracte-

riza por estar bajo la influencia de una adecuada producción a nivel del hipotálamo del factor de liberación de las gonadotropinas (GnRH) y la secreción hipofisiaria de FSH (hormona estimulante de células de Sertoli) y LH (hormona estimulante de las células de Leydig), al igual que de esteroides sexuales que se producen en las células de Leydig a nivel gonadal (4). La liberación continua de LH ocurre entre 10 y 20 minutos aproximadamente de 4 a 8 veces diarias; mientras que las concentraciones de FSH son más bajas pero con unos pulsos de mayor duración que los de LH y con la constante secreción de inhibina a nivel testicular (3).

Las células de Leydig poseen receptores de membrana para LH, y sintetizan y secretan testosterona antes de 30 minutos luego de la liberación de LH. Esta secreción de testosterona es corta, con una duración de entre 20 y 30 minutos (5).

La espermatogenesis se inicia con la división de células fetales germinales para la producción de espermatogonias, las cuales posteriormente van a dar lugar a distintos tipos de células. El lumen de los túbulos seminíferos se establece aproximadamente entre los 5 y 8 meses de edad del ternero. Ocurre una especie de pico de producción de FSH en esta época, lo cual da lugar a una alta proliferación de células de Sertoli, elongación de los túbulos seminíferos, al igual que incremento en el diámetro de los mismos (1).

Cuando la mayoría de estas células diferenciadas aparecen por primera vez en el lumen del tubo seminífero, se alcanza la pubertad (6). En las células germinales en desarrollo existen puentes intercelulares que intercomunican los citoplasmas de estas células, permitiendo que todo un grupo o una cohorte en desarrollo se encuentre interconectado (3).

Los eventos que ocurren durante la espermatogénesis son la espermatocitogénesis y la espermiogénesis.

### **ESPERMATOCITOGENESIS**

Consiste en una serie de divisiones mitóticas desde espermatogonía A hasta lograr la transformación en espermatogonía B, pasando por una serie de espermatogonías como son A1, A2, A3, A4, espermatogonía I (3).

Esta serie de eventos se encuentran bajo una relevante actividad endocrina por medio de la FSH, que a través del sistema sanguíneo actúa desde la hipófisis encontrando receptores en las células de Sertoli, las cuales son células moldeadoras de las células primordiales hasta formarse como espermatozoides; estas células de Sertoli igualmente requieren de un mecanismo de acción paracrino por medio de la testosterona que proviene de las células intersticiales o de Leydig (3, 7).

Luego se inicia la meiosis, que tiene como uno de sus propósitos la reducción en el número de cromosomas en el gameto para lograr un estado haploide. Los espermatozoides primarios son el resultado de la división mitótica previa ya mencionada de espermatogonías B, e inician una primera profase meiótica, la cual posee 5 estados que se conocen como preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno (4). Cada uno de estos estados corresponde al progreso que se va dando en la síntesis y replicación de DNA. Por ejemplo, la fase de preleptoteno inicia la fase de replicación del DNA con formación de tetrámeros que no se separan y que se fusionan aleatoriamente en diferentes puntos conocidos como quiasmata, dando lugar a un entrecruzamiento de materiales de DNA. Esto hace referencia al cruce de segmentos de un cromosoma a su homólogo cuando se separan las cromátidas (3).

De esta forma, la profase de la primera división meiótica asegura la heterogeneidad

genética en cada espermatozoides secundario y la espermátide obtenida será única desde el punto de vista genético (3).

Una vez se obtiene el espermatozoides primario, lo que ha tomado entre 18 y 19 días y que corresponde a un 30% de la espermatogénesis completa, se forma el espermatozoides secundario el cual tiene una duración muy corta, entre 1 y 2 días. Rápidamente el espermatozoides secundario realiza su segunda división meiótica, dando lugar a la formación de una espermátide haploide de tipo esférico (8).

### **ESPERMIOGENESIS**

Durante esta fase, la forma hasta ahora esférica de la célula en transformación cambia drásticamente hasta obtener un espermatozoides completo. Consta de las fases de Golgi, de encaquetamiento, la acrosomal y la de maduración (3, 4).

#### **Fase de Golgi**

Esta fase se caracteriza por los primeros eventos que ocurren en la espermátide y que tienen que ver con la formación del acrosoma que es una organela subcelular que se forma a partir de gránulos proacrosómicos dentro del aparato de Golgi (4).

El aparato de Golgi es un sistema de encaquetamiento que utiliza un grupo de vesículas proacrosómicas, las cuales se fusionan dando lugar a una gran vesícula que se adhiere a la envoltura nuclear. Mientras tanto, los centríolos migran del citoplasma a la base del núcleo. El centríolo proximal formará una especie de base o implante que permitirá la unión de la cabeza con la cola, mientras que el centríolo distal permite el desarrollo del axonema, que será la porción central del flagelo o lo que va a ser la cola del espermatozoides (3, 4).

#### **Fase de encaquetamiento**

En esta fase ocurre la dispersión del gránulo acrosómico sobre la porción anterior del núcleo; el aparato de Golgi se aleja del

núcleo hacia la parte caudal de la espermátide (3). Los componentes del axonema en desarrollo de la cola se alargan más allá de la periferia del citoplasma celular, proyectándose de la espermátide hacia el lumen del túbulo seminífero.

#### **Fase acrosómica**

Se inicia una elongación del núcleo y del citoplasma de la espermátide; se presenta una rotación de cada espermátide para que el acrosoma se dirija hacia la base o pared externa del túbulo seminífero y la cola hacia el lumen del mismo. Existe un sistema de microtúbulos que es conocido como el manchette (manguito), el cual se extiende del área del núcleo posterior, llegando a convertirse algunos de estos microtúbulos en la capa posnuclear. A nivel nuclear igualmente se da la condensación de la cromatina (3).

Esta serie de modificaciones son moldeadas por las células de Sertoli, donde las espermátides se encuentran en este momento profundamente incrustadas (4).

#### **Fase de maduración**

En esta fase hay porciones del manguito que migran hacia la cola y comienzan a desaparecer, mientras que el resto va a formar la capa posnuclear. Las mitocondrias son ensambladas rápidamente en forma helicoidal alrededor del flagelo en la región posterior del núcleo para formar la pieza media.

Alrededor del axonema se forma una vaina fibrosa junto a unas fibras gruesas, las cuales se asocian con los nueve pares de túbulos del axonema y se continúan con las que se encuentran a nivel del cuello. Las células de Sertoli forman la membrana citoplasmática restante luego del alargamiento de la espermátide (4).

### **ESPERMIACIÓN**

Se refiere a la liberación de las espermátides por cuenta de las células de Sertoli dentro del lumen del túbulo seminífero. Las espermátides alargadas se orientan

perpendicularmente a la pared tubular sobresaliendo poco a poco a la luz del túbulo seminífero.

La extrusión gradual de las espermátides se va dando con retención de los cuerpos celulares interconectados. Se considera que una vez separada la espermátide del cuerpo residual, la célula es ya un espermatozoide (4).

Este proceso de espermiación es análogo a la ovulación en la hembra, con la diferencia de que este proceso ocurre continuamente, mientras que en la hembra ocurre de manera pulsátil durante varias semanas (3).

El adecuado entendimiento de la espermatogénesis es de fundamental importancia para comprender los diferentes tipos de anomalías espermáticas que se pueden presentar durante la evaluación reproductiva de un toro.

En los toros Brahman, la espermatogénesis empieza en promedio al noveno mes de edad (6). Su retraso frente a los *Bos taurus* para el inicio de la pubertad se ve igualmente reflejado en el inicio de la espermatogénesis, ya que dicho retraso es atribuido a la larga duración del periodo prepuberal (intervalo entre el inicio de la espermatogénesis y la pubertad), y al inicio tardío de la espermatogénesis (6) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Proceso de espermatogénesis de toros Brahman (6)

| <b>Edad (meses)</b> | <b>Células</b>                                    |
|---------------------|---|
| 8,5                 | Solo Gonocitos                                    |
| 9,5                 | Presencia espermatogonias tipo A                  |
| 11                  | Espermatocitos tardíos (cigotene y paquitene)     |
| 17 – 19             | Espermatozoides en los túbulos de todos los toros |
| 19                  | Espermatogénesis completa                         |

Hay diferencias de tipo morfométrico entre las células espermáticas de toros B taurus y B indicus, siendo los espermatozoides de estos últimos un poco más pequeños y menos elípticos (9).

Las características seminales de los toros púberes son de menor calidad que los de un toro adulto, debido a que en esas etapas es cuando el reproductor recién comienza su producción espermática y su calidad va a estar determinada por una baja motilidad y un mayor porcentaje de anormalidades (10).

## MECANISMOS DE PROTECCIÓN SEMINAL

Existen diferentes tipos de mecanismos que buscan proteger adecuadamente la calidad tanto de los espermatozoides como del plasma seminal durante los procesos metabólicos naturales que ocurren en el semen tanto en su estado en fresco como criopreservado o posdescongelado.

El principal mecanismo que existe busca evitar la formación de ROS (Reactive oxygen species), es decir, un estrés o proceso oxidativo (Peroxidación), durante el cual están involucrados fosfolípidos del espermatozoide, principalmente de la membrana interna del acrosoma, de la pieza media (región mitocondrial) y la cola (11).

El efecto de ROS y radicales libres se da al activarse la cascada de peroxidación lipídica afectando principalmente ácidos grasos no saturados de la membrana plasmática del espermatozoide causando pérdida de la función espermática y apoptosis celular.

Los principales efectos de esta peroxidación lipídica incluyen agotamiento del ATP (Adenosin trifosfato) dando como resultado la pérdida irreversible de la motilidad espermática, una reducción de la fusión oocito-espermatozoide y daño en el DNA (12).

El semen se constituye en un complejo sistema de reducción que busca que exista

un adecuado balance entre el potencial antioxidante del plasma seminal, y las células espermáticas y las actividades prooxidativas como consecuencia del metabolismo espermático, particularmente en condiciones no fisiológicas como cualquier evento de manipulación *in vitro*, lo cual conlleva un aumento en la tasa de peroxidación lipídica espermática (11). Cuando estos mecanismos de defensa no logran mantener un equilibrio con respecto a la formación del grupo ROS, es cuando se habla de estrés oxidativo (13).

Los mecanismos de defensa antioxidativos incluyen un grupo complejo de enzimas entre las que se encuentran la Dismutasa superoxidada (SD), la catalasa, la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), y especialmente la Glutatthione reductasa (GPx).

La localización de GPx se da a nivel del toro en los espermatozoides, testículos y epidídimo, y se logra mediante análisis de inmunofluorescencia, existiendo una alta correlación entre la actividad de esta enzima en el semen y el número de espermatozoides móviles; mientras que no existe actividad de esta enzima en el plasma seminal (12).

Una de las isoformas de la GPx es la PHGPx (Fosfolípido hidroperoxidasa glutatation peroxidasa), la cual es una proteína Selenio dependiente con actividad antioxidante, evita la apoptosis por el proceso de hidroperoxidación, e igualmente posee una función estructural durante la espermatogénesis.

Existen mecanismos no enzimáticos tales como uratos, ácido ascórbico, vitamina E, taurina, carotenos, piruvato y Glutation (GSH). Este último es un tripéptido presente en la mayoría de las células, y tiene un papel protector intracelular contra el estrés oxidativo como cofactor para la GPx que cataliza la reducción del  $H_2O_2$  e hidroperóxidos que resultan tóxicos.

El GSH está presente tanto en el plasma seminal como en los espermatozoides, y re-

duce sus niveles significativamente durante la criopreservación de semen en el toro (11). En toros, a diferencia de otras especies como el humano, es difícil encontrar niveles de catalasas como elemento de evaluación de estrés oxidativo, a menos que se presente una alta concentración de neutrófilos en la muestra.

Bajo temperaturas ambientales moderadas (20 °C), se considera que el testículo se encuentra en el límite de la hipoxia testicular, donde un incremento de la temperatura ambiente da lugar a un incremento en la temperatura testicular, de sus tasas metabólicas y, por tanto, de los requerimientos de oxígeno. El parénquima testicular presenta algún grado de hipoxia, lo cual incrementa los ROS (reactive oxygen species) por el mecanismo de isquemia-reperusión.

El estrés oxidativo es causado por los ROS, lo cual puede ocasionar daño estructural a nivel biomolecular, del DNA, de lípidos, carbohidratos y proteínas, así como de otros componentes celulares (13).

Los mecanismos por medio de los cuales se evalúa el estrés oxidativo son las TBARS (tiobarbituric acid reactive substances), siendo un método indirecto de cuantificación de dicho estrés al medir la concentración del MDA (malondialdehído) (13).

De otro lado, el plasma seminal bovino contiene un grupo amplio de proteínas (algo más de 50) –entre las cuales se encuentra una familia importante– que se conocen como BSP-A1/A2 y BSP-A3, con masas moleculares que están entre 15 y 30 kDa, y que se denominan colectivamente como proteínas BSP, las cuales se ha comprobado que se unen a IGF-II y se encuentran involucradas en capacitación espermática. El grupo de proteínas que se une a los péptidos IGF se denominan IGFBP (14).

Otro grupo de proteínas tales como albúmina, clusterina, y un grupo de péptidos que constituyen el llamado fluido seminal

ácido-proteico, constituido por -aSFP, 5`nucleotidasa- 5`NT, phospholipasa A2-PLA2, participan en la protección de la membrana espermática, en prevención del estrés oxidativo, en la destrucción espermática mediada por el complemento, y como actividad microbiana; otras proteínas del plasma seminal bovino son la osteopontina y la PLA2, que participan en la reacción acrosómica y la interacción oocito-espermatozoide, mientras que las que participan en la interacción con la matriz celular son la clusterina y la metaloproteína 2 inhibidora de tejido; mientras que la aSFP y la espermaadhesina Z13,5`-NT participan de la motilidad espermática (15).

Schmelzinger et ál. (16), caracterizaron el plasma seminal y sus proteínas en toros calificando como buenos, regulares o malos con base en la tasa de no retorno de 225 vacas inseminadas y tasas de producción de embriones *in vitro*. Este estudio no reveló una correlación entre la actividad de las IGFBP en el plasma seminal de los toros y su capacidad de fertilización *in vivo* e *in vitro*.

## TERMORREGULACIÓN TESTICULAR

Es el mecanismo por medio del cual los testículos se mantienen entre 4 y 6 grados centígrados por debajo de la temperatura corporal, siendo este un requerimiento para que se lleve a cabo la espermatogénesis en forma adecuada.

El testículo logra esta baja temperatura por medio de cuatro sistemas:

- Plexo pampiniforme. Es la estructura vascular en la cual la arteria testicular y la vena se encuentran íntimamente relacionadas, permitiendo que la sangre arterial que viene con la temperatura corporal, sea enfriada por la menor temperatura que posee la sangre venosa que viene del testículo.

- **Músculo cremáster.** Es un músculo estriado que se continúa con el oblicuo abdominal interno. Su contracción y relajación permanentes permite el control de la temperatura corporal. Este ascenso y descenso generado por el músculo cremáster facilita la acción del sistema vascular por medio del plexo pampiniforme.
- **Túnica Dartos.** Este músculo liso que se encuentra debajo del escroto e íntimamente relacionado con las tunicas vaginales parietal y visceral, permite la difusión de temperatura hacia el exterior contribuyendo a la termorregulación.
- **Glándulas sudoríparas.** Se encuentran diseminadas a nivel de la piel y conectadas a través de ramas del sistema nervioso autónomo simpático. Al haber un aumento de la temperatura corporal o del escroto, el hipotálamo detecta estos cambios y se genera un arco reflejo que estimula la sudoración escrotal, la cual permite que disminuya la temperatura por evaporación.

Una inadecuada termorregulación que persista en el tiempo, puede dar lugar a alteraciones en las características del tejido testicular, especialmente en los túbulos seminíferos, que se conoce como degeneración testicular (17). Esta alteración inicialmente se refleja en una inadecuada producción de espermatozoides tanto en cantidad como en motilidad y morfología normales; pero de persistir puede dar lugar a la ausencia de producción espermática y a una posterior atrofia testicular (17).

## **FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD SEMINAL**

### **INFECCIOSOS**

#### **Virales**

Los virus han sido detectados a nivel testicular, y encuentran en la barrera hemato-testicular un adecuado mecanismo para

evitar los dispositivos de defensa y los posibles tratamientos que se lleven a cabo para atacarlos, lo que conlleva que el testículo se convierte en un adecuado reservorio para los virus entre otros agentes infecciosos (18).

El herpes virus bovino (BHV-1) causante de la Rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) puede estar presente en el semen de toros subclínicamente infectados y los cuales son sero-negativos (18).

La familia de herpes virus ha sido detectada dentro del espermatozoide de especies como el hombre, y se pueden replicar a nivel testicular pero no necesariamente dentro del epitelio seminífero. Siendo un virus que sobrevive a la criopreservación, se ha planteado tratamiento del semen previo a la congelación con elementos como tripsina en forma similar a los embriones, con el inconveniente de que se altera la membrana plasmática de los espermatozoides (19).

Igualmente, se plantea el uso de diluyentes para criopreservación con gammaglobulinas donde se reduce el riesgo de infección de semen contaminado y no se afectan los espermatozoides en motilidad y morfología (19).

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) puede ser transmitido en el semen en alta concentración pero no se ha asociado con alteración en la morfología espermática. El virus puede ser aislado de las glándulas sexuales accesorias, de los testículos y del semen (20). Se ha reportado cómo un toro seropositivo y aun no virémico, evacúa persistentemente virus en el semen.

Esta situación permitiría que en un toro que se infecta antes de la pubertad, donde aún no se ha terminado de formar la barrera hemato-testicular, el virus se replique dentro de los testículos evadiendo al sistema inmune (21).

Este virus (BVDV) puede sobrevivir la criopreservación causando infección en

hembras, y se asocia con infertilidad especialmente en novillas, causando fallas a nivel de la concepción y permitiendo adicionalmente una mayor difusión del virus (21).

Otro virus que a la fecha es exótico en Colombia, es el orbivirus de la Lengua azul (BTV), el cual se elimina en el semen en alta concentración y se asocia con defectos de los espermatozoides, siendo detectadas partículas virales en el núcleo de los espermatozoides del toro afectado (22).

#### Infeciosos no virales

Otro tipo de microorganismos distintos a los virus y que pueden afectar la calidad del semen son los *Mycobacterium*, siendo el *avium* subespecie *paratuberculosis* eliminado por el semen y aislado de órganos reproductivos de toros infectados; aunque no está completamente determinado si el semen puede o no transmitir la enfermedad vía uterina (23).

La leptospirosis se constituye en una importante causa de infertilidad en bovinos, siendo la *L. interrogans*, *borgpeterseneii* y

*kirschneri*, con sus respectivos serovares, las más representativas en medicina veterinaria. Los toros infectados pueden eliminar *Leptospira* en semen y orina durante meses y transmitiendo la enfermedad por monta directa; además de que en algunos casos esta espiroqueta puede sobrevivir a la criopreservación (24).

Tanto *Ureaplasmas* como *Mycoplasmas* se adhieren al espermatozoide por medio de receptores específicos, que en el caso del *Ureaplasma diversum* es un sulfoglicolipido, y pueden inducir fragmentación del DNA ya sea por decondensación, denaturación, o por rompimiento de bandas de DNA, lo cual no muestra un daño espermático inmediato, pero sí problemas en el desarrollo y la implantación embrionaria (25).

Se ha comprobado que semen infectado con *Mycoplasma mycoides*, durante el proceso de incubación para realizar fertilización *in vitro*, redujo la eficiencia del tratamiento con Calcio ionoforo (proceso rutinario). Adicional a esto, los esperma-

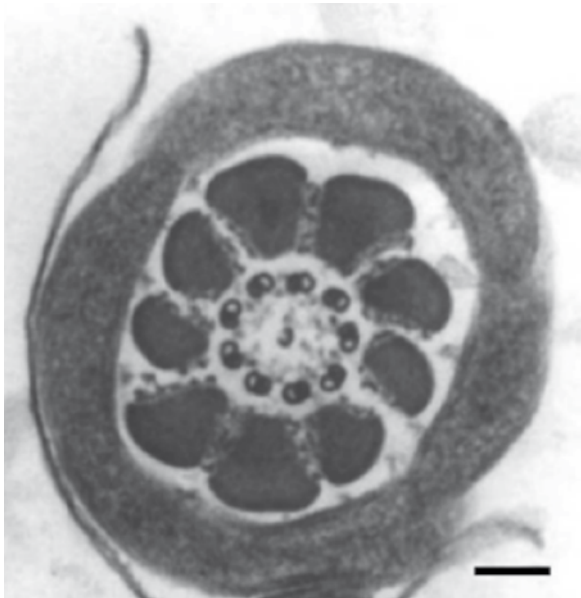


Figura 2. *Mycoplasma* contaminated spermatozoon mid-piece showing numeric deletion of the central singlets (9+1) and the absence of the dimein arms Bar 100 mm.



tozoides a nivel de sus microtúbulos del axonema muestran alteración morfológica y defectos estructurales (Figura 1). Esto representa una franca disminución en la motilidad espermática como consecuencia de anomalías de la pieza media (26).

Durante el desarrollo de embriones *in vitro* se aprecian menores tasas de desarrollo, y se observan partículas adheridas a la zona pelúcida, especialmente en el estado de dos-cuatro células.

Se han realizado diferentes tratamientos antibióticos en toros infectados con *Mycoplasma bovis*, tanto en forma parenteral, como a nivel del semen fresco previo a llevar a cabo criopreservación, dando resultados poco alentadores y apreciando una reducida disminución en las colonias del microorganismo una vez el semen fue descongelado (27).

En lo que hace referencia a la flora bacteriana a nivel del semen antes y después de la congelación, Daniel et ál. (28), encontraron como las bacterias más frecuentes, *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* y otros *Staphylococcus*. En el semen descongelado se encontró que el 80% de las muestras fueron negativas a unidades formadoras de colonias (UFC), pero un 20% de las muestras resultaron positivas (Tabla 2).

Asimismo, en las mejores condiciones de recolección de semen se presenta una contaminación superior a  $1 \times 10^4$  UFC/mL. No hay datos que permitan correlacionar

este tipo de crecimiento bacteriano y alteraciones de la fertilidad del toro (28). Dentro de la calidad bacteriológica aceptada para pajillas de semen congelado se espera obtener un recuento menor a 500 UFC totales.

Es importante tener en cuenta que el nitrógeno líquido se considera una fuente de alta contaminación de patógenos no específicos (29).

El rápido desarrollo de las vesículas seminales al llegar los toros a la pubertad predispone a la presentación de infección de origen hematógeno en estas glándulas sexuales accesorias, siendo observadas vesiculitis entre 2-10% en toretes entre 1 y 2 años de edad. Habiéndose postulado como dietas ricas en energía y con consecuentes episodios de ruminitis, son causa primaria de vesiculitis en toretes (30). La evaluación del semen de estos animales, y de cualquiera que presente vesiculitis, muestra pus y/o leucocitos, dando lugar a una alteración en la calidad por un marcado aumento de ROS (reactive oxygen species), y el semen se ve sometido a un alto grado de estrés oxidativo. El caso más crítico es cuando la vesiculitis se debe a *Brucella* sp, con el impacto que presentaría sobre la salud pública.

Existen otra serie de agentes infecciosos tales como *PI3* (Parainfluenza 3), *Trichomonas* f, *Campylobacter* f, *Brucella*, entre otros, los cuales afectan de una u otra forma la calidad seminal, pero que no serán tratados en este documento.

**Tabla 2.** Conteo total de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL en se fresco y congelado.

| UFC por mL       | Semen fresco |      | Semen congelado |      |
|------------------|--------------|------|-----------------|------|
|                  | Muestras     | %    | Muestras        | %    |
| 0                | 0            | 0,0  | 40              | 80,0 |
| $1 \times 10^2$  | 8            | 16,0 | 4               | 8,0  |
| $1 \times 10^3$  | 13           | 26,0 | 2               | 4,0  |
| $1 \times 10^4$  | 16           | 32,0 | 2               | 4,0  |
| $>1 \times 10^4$ | 13           | 26,0 | 2               | 4,0  |

## NO INFECCIOSOS

### Factores medioambientales

El estrés calórico, sumado a la humedad, impiden que los mecanismos termorreguladores del toro sean capaces de mantener un equilibrio que no afecte la calidad seminal (31, 32). Se ha reportado que la temperatura ambiental y la lluvia están correlacionadas positivamente con el porcentaje de anomalías espermáticas tanto en *Bos indicus* como cruces con *Bos taurus* a una temperatura superior a los 31 °C.

Mathevon (33) ha reportado que los toros Holstein producen semen más concentrado durante la primavera y el invierno en países de estaciones, mientras que Godfrey y Lunstra (34) reportan que toros *Bos indicus* sufrieron de estrés térmico por frío, lo que se reflejó en la calidad del semen colectado en esa época del año.

En África se ha reportado que el volumen, la concentración espermática y la morfología normal se ven afectados durante la época de verano en toros *Bos indicus*.

Se reportan igualmente diferencias entre individuos en cuanto a la capacidad de tolerancia al estrés calórico; algo muy importante para tener en cuenta, además de la temperatura del día de la colecta, es la temperatura promedio de los días previos y especialmente cuando los espermatozoides se encuentran en su última fase de maduración a nivel del epidídimo, por no decir que los 60 días anteriores que involucren todo un ciclo de espermatogénesis (35).

Para que el testículo logre mantener una temperatura ideal de 33-34,5 °C, debe mantener una termorregulación testicular constante, siendo la temperatura ambiental ideal para ello entre 18 y 22 °C, por tanto, el uso de aire acondicionado en centros de inseminación artificial, tanto en Norteamérica como en Europa, es una de las soluciones al impacto calórico, especialmente en el verano (35).

### Razas

La explicación de por qué un toro *Bos taurus* disminuye su fertilidad comparado con un toro *Bos indicus*, cuando se encuentra en condiciones tropicales se entiende en el hecho de presentar un alto índice de estrés oxidativo. Este ocurre a nivel intratesticular y dará lugar a una inadecuada calidad del semen una vez se obtenga un eyaculado tanto por monta directa o por colecta (13).

Algunos autores reportan que los toros *Bos indicus* presentan siempre una menor producción y menor calidad espermáticas, sin importar bajo qué condiciones se encuentran en comparación con los *Bos taurus* (36).

Hofflack, Opsomer et ál. (37), encontraron mayores porcentajes de motilidad progresiva evaluada por el método CASA (Computer-assisted motility analysis) en toros de la raza Holstein, comparados con toros de la raza Belga Azul, manejados en condiciones de campo similares. Iguales resultados se dieron en lo referente a morfología espermática, por lo que se asume que existe un componente genético responsable de este tipo de diferencias en dos razas distintas.

Algunas otras diferencias por genotipo frente a situaciones medioambientales son mencionadas en el párrafo anterior, y en el relacionado con la edad de los toros.

Hay trabajos en los cuales la actividad enzimática de GPx como mecanismo antioxidativo, al ser catalizador de ROS, fue significativamente mayor en toros Simmental frente a toros Nelore (13). Este mismo autor manifiesta la necesidad de realizar más trabajos con el objeto de evaluar los efectos de pro-oxidantes o antioxidantes sobre la calidad seminal.

### Edad

En general, las razas *Bos taurus* es más precoz en desarrollo sexual y, por tanto, su calidad seminal en animales menores de 2

años es mejor en cuanto a motilidad, morfología y concentración.

La alta prevalencia de gotas citoplasmáticas proximales en toros cebú Brahman de 2 años de edad puede ser el resultado de inmadurez sexual de este tipo de razas comparadas a las Bos indicus bajo condiciones tropicales (31).

Toros Holstein de 7 años de edad mostraron una mayor morfología espermática normal en comparación con grupos de la misma raza de 3 y 5 años, mientras que para los mismos grupos no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto a la motilidad espermática (38).

De otro lado, investigadores de este mismo grupo encontraron que la motilidad espermática en toros Swedish red and white fue significativamente mayor en animales de 4 que de 1 año de edad ( $p < 0,01$ ).

Los toros mayores, generalmente de más de 10 años de edad, presentan lesiones fibróticas en los testículos, lo cual se traduce en una mala calidad espermática, especialmente en elevados porcentajes de morfología anormal y en disminución de la concentración.

Una de las posibles explicaciones de esta fibrosis para toros criados en condiciones de trópico es la distensión testicular y escrotal como componente del mecanismo de termorregulación, generando un trauma permanente a nivel del parénquima testicular (39). Otros autores no relacionan los grados de fibrosis testicular con mala calidad seminal, y aducen la presentación de este tipo de fibrosis a la aplicación de algunos tipos de vacunas para controlar entidades respiratorias (10).

Asimismo, cualquier causa de degeneración testicular presenta inicialmente fibrosis a nivel del parénquima testicular y, en caso de que sea progresiva, terminará haciendo parte todo el parénquima testicular y desarrollará atrofia del testículo afectado (40).

### Nutricionales

La nutrición es un aspecto fundamental en el inicio de la pubertad y en el transcurrir de la vida reproductiva del toro. Tanto los excesos como los defectos en la dieta se pueden ver reflejados en la calidad del semen a nivel de los espermatozoides y del plasma seminal.

Está comprobado que la calidad del alimento es un factor importante que contribuye al desarrollo de la pubertad y a la formación espermática durante su vida productiva.

Los animales que reciben dietas balanceadas van a ser más precoces que individuos que se consideran subalimentados. El peso corporal ayuda a predecir la edad de pubertad en razas cebuinas, donde es importante tener en cuenta la tasa de crecimiento antes y después del destete, la cual se determina en forma importante con base en el crecimiento esquelético.

En los casos de toros subalimentados se retrasa la pubertad debido a que se disminuye la producción de IGF-1 y, en consecuencia, se retarda la producción de LH y testosterona, hormonas de gran importancia en la madurez sexual del macho.

Dietas balanceadas con pastos ricos en energía, y un adecuado porcentaje de proteína, son benéficas en el inicio de la pubertad, ya que favorecen un desarrollo testicular más rápido, especialmente durante edades entre 10 y 15 meses.

De otra parte, la desnutrición tiende a atrasar el inicio de la pubertad, así como las dietas no balanceadas por exceso (sobrecondicionamientos), llevando incluso a alteraciones irreversibles en los toros, tanto a nivel físico como de calidad espermática. Efectos indirectos de sobrealimentación como obesidad y problemas de pezuñas y patas también pueden contribuir a una menor libido (22).

El gossypol, que es un compuesto fenólico producido por el algodón (*Gossypium spp*), causa en el toro reducción en el número de espermatozoides en el eyaculado debido a alteraciones en la membrana basal de los túbulos seminíferos, siendo la lesión específica de la pieza media del espermatozoide una aplasia de la envoltura mitocondrial. Esta alteración conlleva una falla a nivel de la motilidad espermática, y es difícil de apreciar por medio de microscopio de luz (22).

### **Estrés**

Existen diferentes tipos de estrés o tensión que pueden afectar a un toro en su calidad reproductiva y en particular en la calidad seminal. Hay estrés calórico, social, por dieta (exceso o defecto), entre otros.

El principal mecanismo por medio del cual el estrés puede dar lugar a una inadecuada calidad seminal se basa en la hormona conocida como CRH –factor liberador de la hormona corticotropa (ACTH)–, el cual desencadena la cascada del estrés con acciones de tipo inhibitorio tanto a nivel testicular como central con la inhibición de la hormona LH (41).

El CRH es secretado a nivel hipotalámico, pero en situaciones estresantes también es producido por las células intersticiales o de Leydig a nivel testicular (iniciado por Serotoninas), actuando en los receptores en la membrana de las células de Leydig como un potente regulador negativo para la LH cuyos principales receptores se encuentran en estas células intersticiales, dando lugar a un bloqueo por medio de una proteína quinasa C como respuesta al estrés. Así se impide la producción de andrógenos por dichas células, recordando el papel fundamental que la testosterona y la dihidrotestosterona ejercen a nivel de la espermatogenesis.

Las células de Sertoli, en su actividad de moldeadoras y activadoras de las células primordiales (Espermatogonias en adelan-

te), requieren como hormonas de estímulo tanto la hormona FSH como los andrógenos mencionados. En caso de que algo de este mecanismo falle, la consecuencia se ve reflejada en la cantidad y calidad de espermatozoides producidos (41).

Concomitante a esta situación, CRF estimula la producción por las células de Leydig de  $\beta$ -endorfinas las cuales a través de un mecanismo paracrina bloquean la producción de receptores de las células de Sertoli para la acción de FSH, impidiendo que estas ejerzan su función durante la espermatogenesis y dando lugar a una disminución en la producción espermática. Mecanismo similar al que ocurre en toros que viven en países de estaciones y que es influenciado por la intensidad lumínica.

### **Otros**

Dentro de la clasificación de otros factores que podrían afectar la calidad del semen se debe incluir el sistema de colecta, métodos de criopreservación del mismo, entre otros.

### **Criopreservación**

Los espermatozoides sometidos a criopreservación están sujetos a una serie de alteraciones en su estructura, tales como dilatación y rompimiento a nivel de la membrana, con cambios de permeabilidad en la misma. Hay cambios en la estructura de fosfolípidos y proteínas (siendo clasificados 27 tipos entre la SM40 y la SM391), que traen como consecuencia una reducción en su motilidad y viabilidad espermáticas (42, 43).

Estos cambios estructurales dan como resultado una prematura capacitación espermática, lo que afectaría la vida media de los espermatozoides y su capacidad fertilizante; existen diversos trabajos que correlacionan la presencia de capacitación espermática prematura en semen descongelado con su capacidad fertilizante (42, 44). Algunos autores mencionan alteraciones

en la cromatina o en la integridad del DNA (45).

Las alteraciones que ocurren durante el sexaje del semen son similares a las descritas en cualquiera de los eventos en que ocurre estrés oxidativo y que ya se explicaron; estos eventos son de gran importancia en biotecnología reproductiva y pueden conllevar deterioro en su calidad. Sin embargo, cuando la calidad del semen es buena, los espermatozoides son capaces de soportar criopreservación, descongelación, ser sometidos a citometría de flujo para el sexaje y, posteriormente, ser recongelados, reportándose después de estos procesos motilidad adecuada e integridad del acrosoma (44).

Hay distintas técnicas de laboratorio que permiten predecir el potencial reproductivo de los toros cuyo semen ha sido criopreservado. Zhang y Larsson (46) evaluaron, mediante fertilización *in vitro*, tasas de blastocistos (clivaje) y pruebas de adhesión a la Zona pelúcida (ZBA) –pruebas que son de rutina en biotecnología reproductiva como el ovum pick up y posterior fertilización *in vitro*–, con adecuados resultados con semen de toros de diferentes razas, pero que al ser utilizados en inseminación artificial mostraron altas tasas de retorno al celo de las vacas servidas.

Existe la posibilidad de que la calidad en la motilidad espermática y el volumen del eyaculado sufran alguna alteración por el sistema de colecta, en particular por el tipo de aparato utilizado para la electroeyaculación (47).

Los factores que pueden afectar la calidad seminal en toros son diversos y pertenecen a un campo de la andrología muy amplio, siendo la pretensión de este documento abordar el tema en la mejor forma posible. La bibliografía citada puede profundizar más en las inquietudes que estos temas suscitan, o en caso de querer comunicarse

con el autor de este tema se puede acudir al correo electrónico.

## REFERENCIAS

1. Curtis S K, Amann RP. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *J Anim Sci* 1981; 53 (6): 1645-57.
2. Lunstra DD, Echternkamp SE. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *J Anim Sci* 1982; 55 (3): 638-48.
3. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 1<sup>st</sup> revised edition. Current conceptions, Inc.; 1999.
4. Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. México: Interamericana McGraw Hill; 1993.
5. Kaneko JJ, Lozano JW, Bruss ML. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Fifth edition. Academic Press; 1997.
6. Aponte PM, DG de Rooij et ál. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology* 2005; 64 (6): 1440-55.
7. Berndston WE, Desjardins C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat* 1974; 140 (2): 167-79.
8. Amman. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J Dairy Sci* 1983; 66: 2006-2622.
9. Beletti ME, Costa Lda F et ál. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci* 2005; 85 (1-2): 105-16.
10. Barth AD, Alisio L et ál. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality; *Anim Reprod Sci* 2008; 106: 274-288.
11. Stradaoli G, Noro T et ál. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology* 2007; 67 (7): 1249-55.

12. Vaisberg CN, Jelezarsky LV et ál. Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. *Theriogenology* 2005; 64 (2): 416-28.
13. Nichi M, Bols PE et ál. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 2006; 66 (4): 822-828.
14. Asadpour R, Alavi-Shoushtari SM et ál. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability; 2007.
15. Moura AA, Chapman DA et ál. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci* 2006; 98 (3-4): 169-88.
16. Schmelzer CH, Swaisgood HE, Horton HR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1982), 107:196-201.
17. Brito LF, Silva AE et ál. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology* 2004; 61 (2-3): 511-28.
18. Chenoweth PJ. Influence of the male on embryo quality. *Theriogenology* 2007; 68 (3): 308-15.
19. Silva N, Solana A et ál. Inactivation of bovine herpesvirus 1 in semen using a hyperimmune egg yolk semen extender. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47 (1): 69-75.
20. Fray MD, Paton DJ et ál. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 615-27.
21. Niskanen R, Alenius S et ál. Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine virus diarrhoea virus infection localized in the testes. *Reprod Domest Anim* 2002; 37 (3): 171-5.
22. Chenoweth PJ, Chase CC Jr et ál. Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. *Theriogenology* 2000; 53 (5): 1193-203.
23. Herthnek D, Englund S, Willemsen PTJ. Sensitive detection of subsp. In bovine semen by real-time PCR; 2006.
24. Sanderson MW, Gnad DP. Biosecurity for reproductive diseases. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2002; 18 (1): 79-98.
25. Miller R, Chelmonska-Soyta A et ál. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1994; 10 (3): 479-90.
26. Sylla L, Stradaoli G et ál. The effect of *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* LC of bovine origin on in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa and embryo development. *Anim Reprod Sci* 2005; 85 (1-2): 81-93.
27. Visser IJ, ter Laak EA et ál. Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Theriogenology* 1999; 51 (4): 689-97.
28. Givens D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. *Theriogenology* 2008; 70 (3):504-507.
29. Chandler J. Comunicación personal; 2006.
30. Martínez MF, Barth AD. Early detection and treatment of vesicular adenitis in bulls. *Anim Reprod Sci* 2007; 101 (3-4): 252-6.
31. Chacon J. Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the tropics. *Reprod Domest Anim* 2001; 36 (2): 91-9.
32. Brito LF, Silva AE et ál. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci* 2002; 70 (3-4): 181-90.
33. Mathevon M, Buhr MM, Dekkers JCM. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 1998; 81: 3321-3330.

34. Godfrey RW, Lunstra DD et ál. Effect of location and season on body and testicular growth in Brahman and Hereford bulls. *J Anim Sci* 1990; 68 (6): 1520-9.
35. Fuerst-Waltl B, Schwarzenbacher H et ál. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Anim Reprod Sci* 2006; 95 (1-2): 27-37.
36. Fields MJ, Cornelisse KM. Aspects of the sexual development of Brahman versus Angus bulls in Florida. *Theriogenology* 1982; 18: 17-31.
37. Hoflack G, Opsomer G et ál. Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian blue and Holstein-Friesian bulls. *Reprod Domest Anim* 2007; 42 (2): 153-61.
38. Hallap T, Haard M et ál. Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at 1 and 4 years of age. *Int J Androl* 2004; 27 (3): 166-71.
39. Angarita E. El uso del ultrasonido en pruebas de fertilidad en los toros. *El Cebú* 2000; 314: 59-66.
40. Lozano H, Jiménez C. Seguimiento de la circunferencia escrotal, calidad seminal y ecotextura testicular en toros Brahman entre 18 y 24 meses de edad. *Memorias VII Simposio Internacional de Reproducción Animal*. Córdoba, Argentina; 2007.
41. Dufau ML, Tinajero JC et ál. Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J* 1993; 7 (2): 299-307.
42. Thundathil J, Gil J et ál. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int J Androl* 1999; 22 (6): 366-73.
43. Roncoletta M, Morani Eda S et ál. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci* 2006; 91 (1-2): 77-87.
44. Maxwell WM, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999; 52 (8): 1353-62.
45. Khalifa TA, Rekkas CC. *Animal Reproduction Science*; 2007.
46. Zhang BR, Larsson B et ál. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *Int J Androl* 1999; 22 (4): 253-60.
47. Echeverri JA. La verdad sobre la electroeyaculación. *El Cebú* 1990; 252: 40-43.