

- La pubertad en el macho, lo mismo que en la hembra, tiene un comienzo variable y se halla subordinada a influencias idénticas, como la raza y la alimentación. El período prepuberal puede dividirse en varias etapas. Los testículos descienden al escroto en el momento del nacimiento. El tejido testicular comienza a diferenciarse a los 3 - 4 meses de edad con la aparición de espermatoцитos. Hacia los 6 meses ya existen espermatozoides maduros. Después de los 7 meses los espermatozoides ya pueden tener capacidad fecundante (madurez sexual). La capacidad fecundante del semen puede ser bastante baja al principio, pero aumenta rápidamente con la edad.

La pubertad en los machos algunos autores la definen también como la edad a la cual un torito produce un líquido espermático que contiene como mínimo 500 espermatozoides por mm³ con no menos de 10 % de motilidad.

El deseo de copular (libido) es algo variable, pero generalmente sigue a la aparición de espermatozoides maduros, cuya presencia autoriza al uso muy limitado del macho. Es necesario tener en cuenta que si el macho es muy joven, pueden existir problemas mecánicos para la cópula, tales como que no alcance la vagina y/o que por el esfuerzo en alcanzarla se produzca un prolapso de recto.

Como en la vaquillona, el macho debe alcanzar cierto tamaño corporal antes de llegar a la pubertad, que se produce normalmente entre los 7 y 13 meses de edad, pero que puede retrasarse en caso de restricción alimenticia.

Es virtualmente imposible por carencia alimenticia provocar la extenuación en el macho hasta el punto de que no se produzca pubertad, siempre que finalmente alcance cierto tamaño corporal (madurez reproductiva), lo que puede requerir varios años en animales sometidos a dietas muy limitadas. Lunstra et al informan que, independientemente de las razas o sus cruzamientos, la circunferencia escrotal predice con mayor exactitud cuando un toro llega a la pubertad que otros índices como son el peso corporal o la edad. Los toros de este estudio llegaron a la pubertad con 27,9 cm ($\pm 0,2$ cm), siendo el desarrollo testicular posterior a la pubertad.

○ 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 seronegativos (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 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 hematotesticular, el virus se replique dentro de los testículos evadiendo al sistema inmune.

Infecciosos 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. 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. Tanto Ureaplasmas como Mycoplasmas se adhieren al espermatozoide por medio de receptores específicos, que en el caso del *Ureaplasma diversum* es un sulfoglicolípido, 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 in- mediato, pero sí problemas en el desarrollo y la implantación embrionaria.

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).

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.

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

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.

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 respecto a la motilidad espermática.

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.

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.

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.

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.

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.

El impulso sexual del macho entero (sin castrar), libido, viene determinado por niveles hormonales. Puede variar en función de: edad, especie (mayor en animales de reproducción estacional), raza (menor en las razas cárnicas que en las lecheras), estado sanitario y condiciones medioambientales.

- La eyaculación se puede dividir académicamente en varias fases:

Emisión

Durante la emisión, los conductos deferentes y las ampollas deferenciales se contraen para impulsar los espermatozoides desde el epidídimo en sentido distal hacia la uretra prostática.

El contenido espermático se va mezclando con los fluidos de las vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales. El semen se acumula en la uretra prostática gracias a que tanto el complejo esfinteriano interno (liso) como el esfínter estriado externo permanecen cerrados. Al mismo tiempo, se van produciendo las secreciones de las glándulas uretrales para facilitar la lubricación de la uretra. Esta fase está regulada fundamentalmente por el sistema nervioso simpático dorsolumbar (D12-L2).

Cámara de alta presión

La uretra prostática se transforma en una cámara de alta presión cuando permanecen cerrados los dos esfínteres. Al contraerse el esfínter interno el veru montanum se acerca hacia la luz. Actúa en forma de tapón y dilata la uretra prostática durante un breve período de tiempo. Gracias, por último, a la rigidez del pene erecto, se comporta como si

de un arma de fuego se tratase. Esta fase es controlada por los sistemas sim- pático y parasimpático.

Expulsión

El aumento de presión en la cámara posterior, junto con las contracciones clónicas de los músculos perineales y el peristaltismo uretral, condicionan una proyección anterógrada del eyaculado. La salida de semen no es continua, sino discontinua, rítmica, espasmódica. El primer chorro, con una velocidad superior a 50 km/h, permite alcanzar las zonas más profundas de la vagina; los siguientes impulsos son de menor velocidad. Tras la abertura del esfínter externo, manteniéndose cerrado el interno, y mediante estas contracciones rítmicas que forman parte del proceso eyaculatorio, el semen es propulsado hacia la uretra penénea. Forzado por la presión de la cámara, los pulsos de eyaculado de semen empiezan a fluir.

- La infertilidad en el macho bovino es una condición que afecta la reproducción y que genera gran cantidad de pérdidas y disminución en la productividad de los hatos, Las principales causas de infertilidad en el macho sugieren situaciones de manejo inadecuado como nutrición y sanidad. Además de alteraciones propias de la reproducción como: disminución de la libido, impotencia copulatoria e impotencia generativa, es por estas condiciones que se hace necesario evaluar la fertilidad de los machos en el momento de su escogencia para un hato.
- La inseminación artificial ha tenido una gran importancia en el mejoramiento genético de los animales, especialmente en el ganado bovino donde su práctica es un requisito indispensable para acceder a animales de altas producciones en un corto período de tiempo y así poder ser competitivo en un mercado tan estrecho.
- gel con jeringa. Algunos modelos de V.A. traen botellas recolectoras con filtros incorporados que permiten realizar la operación de filtrado al mismo tiempo que la recolección. Recolectión del semen Para la recolección de semen equino puede utilizarse como súcubo una yegua en celo natural o una yegua ovariectomizada mantenida con altos niveles de estrógenos exógenos (1-2mg cipionato de estradiol, ECP, vía intramuscular semanalmente). También pueden utilizarse súcubos artificiales, para los cuales el padrillo debe estar entrenado. Estos dos últimos métodos permiten disponer de un súcubo aún en la temporada anovulatoria. Previo a la recolección, el pene del padrillo debe ser examinado para detectar posibles lesiones. Para lograr la exteriorización del pene, se presenta la yegua al padrillo de modo que ni ella, ni el macho ni el personal corran peligro y puedan realizarse las maniobras apropiadamente.

EVALUACION DEL SEMEN Una vez obtenido el eyaculado debe ser transportado lo antes posible al laboratorio protegiéndolo de la luz solar, y el shock por frío. Todos los elementos utilizados para la evaluación deben estar pre calentados a 37° C. Observación y filtrado. El primer paso es el filtrado de la muestra para eliminar posibles detritus y la porción gelatinosa. Se observa el color, densidad y volumen de la porción libre de gel y el volumen de la porción gelatinosa. El volumen por sí mismo no posee correlación positiva con la fertilidad, pero se utiliza para calcular el número total de espermatozoides. El examen del color permite observar la presencia de sangre, orina o material purulento en el eyaculado. Concentración espermática. El cálculo del número total de espermatozoides es importante ya que éste es uno de los parámetros más usados

para estimar la fertilidad de un padrillo aunque esté sujeto a múltiples factores de variación, como por ejemplo: estación del año, frecuencia de servicios, edad, tamaño testicular, etc. El número total de espermatozoides se obtiene por la multiplicación de la concentración espermática por el volumen de la porción libre de gel del semen. La concentración puede calcularse mediante un espectrofotómetro o por hemocitometría utilizando una cámara hemocitométrica. Existen distintos modelos de cámara con un reticulado labrado característico, pero todas responden a los mismos principios. Describiremos el modelo de Neubauer por ser el más utilizado. La cámara de Neubauer posee un retículo central para el recuento de glóbulos rojos y un retículo periférico especial para el de glóbulos blancos. El retículo central consta de 16 cuadrados grandes separados entre sí por triples líneas excepto en dos de sus bordes, es decir que 7 cuadrados poseen en uno de los contornos líneas simples. Estos cuadrados grandes están divididos en 16 cuadraditos cada uno. Por lo tanto existen en total 256 cuadraditos cuya superficie individual es de $1/400 \text{ mm}^2$. Fig. 1. Reticulado de la cámara de Neubauer. Esta cámara posee dos compartimentos reticulados independientes, por lo tanto se realiza el recuento en las dos cámaras y se promedia el resultado.

- El semen se guardará en portapajuelas identificados en la parte superior, dentro de los canastillos. Durante su almacenamiento, es importante que el semen permanezca en nitrógeno líquido, ya que cualquier exposición a altas temperaturas irá en detrimento de su viabilidad.
- Se debe realizar mediante la observación visual. Una persona que observe el rodeo e identifique el indicador (único) de celo que es la pasividad a la monta. La frecuencia de observación debería ser de dos a tres veces al día (mañana, mediodía y tarde).
- es el último paso en cualquier tratamiento de FIV/ICSI y puede que uno de los puntos más importantes. Su éxito depende, no sólo del potencial biológico de los embriones y de la receptividad endometrial, sino también de que la intervención sea técnicamente correcta.

Condiciones aplicables al equipo de producción de embriones

El equipo de producción de embriones es un grupo de técnicos capacitados para proceder a la recolección y al tratamiento de ovarios u ovocitos así como a la producción y a la manipulación de embriones producidos in vitro. El equipo comprende por lo menos un veterinario y reúne las siguientes condiciones:

- 1) El equipo deberá ser aprobado por la autoridad competente.
- 2) El equipo debe estar supervisado por un veterinario miembro del mismo.
- 3) El veterinario del equipo es responsable de todas las actividades del equipo, que incluyen las extracciones de ovarios y ovocitos en condiciones de higiene apropiadas y todos los demás procedimientos inherentes a la producción de embriones destinados a los intercambios internacionales.

4) El personal del equipo debe estar debidamente adiestrado para aplicar las técnicas y los principios de control de enfermedades y debe respetar reglas de higiene estrictas para evitar la introducción de infecciones.

5) El equipo de producción debe disponer de las instalaciones y del material necesarios para: a) la recolección de ovarios u ovocitos; b) la manipulación de ovocitos y producción de embriones en un laboratorio fijo o móvil; c) el almacenamiento de ovocitos o embriones.

No es necesario que estas instalaciones estén situadas en el mismo lugar.

6) El equipo de producción de embriones debe llevar un registro de sus actividades, que conservará durante, por lo menos, los dos años consecutivos a la exportación de los embriones para presentarlo a los Servicios Veterinarios en caso de inspección.

7) El equipo de producción de embriones será inspeccionado periódicamente al menos una vez al año por un veterinario oficial para asegurarse de que respeta las normas sanitarias durante la recolección y la manipulación de los ovocitos así como durante la producción y el almacenamiento de los embriones.

Artículo 4.9.3.

Condiciones aplicables a los laboratorios de manipulación

El laboratorio de manipulación utilizado por el equipo de producción de embriones puede ser móvil o fijo. Puede estar situado en las cercanías del lugar de extracción de los ovocitos o estar alejado del mismo. Es un local en el que los ovocitos extraídos de los ovarios son madurados y fecundados y en el que los embriones resultantes son después cultivados in vitro.

En este laboratorio, los embriones también pueden ser sometidos a cualquier tratamiento necesario, como el lavado, antes de ser conservados y aislados en cuarentena.

Además:

1) El laboratorio debe estar bajo la supervisión directa del veterinario del equipo y ser inspeccionado periódicamente por un veterinario oficial.

2) Durante las operaciones de producción que preceden la conservación de los embriones destinados a la exportación en ampollas, frascos o pajuelas, no deberá ser extraído ni manipulado en el mismo laboratorio ningún ovocito o embrión de condición sanitaria inferior.

3) El laboratorio debe estar protegido contra roedores e insectos.

4) El laboratorio debe estar construido con materiales que permitan una limpieza y una desinfección eficaces. Estas operaciones deberán efectuarse con frecuencia y siempre antes y después de cada manipulación de embriones para la exportación.

5) El laboratorio de manipulación deberá disponer y utilizar instalaciones apropiadas para manipular y tratar los embriones destinados a la exportación, de acuerdo con las recomendaciones del Manual de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS).