

# Avances biotecnológicos en reproducción de búfalos

William G. Vale<sup>1</sup>

## Reproducción en el macho: tecnología del semen y reproducción asistida

### Introducción

La criopreservación del semen para la inseminación artificial (IA) ha servido como un instrumento para la amplia difusión del material genético de los animales de alta producción, para la cual es necesario que el material fecundante de los machos sea sometido a tecnologías eficientes (Vale, 1994). En Brasil este mejoramiento genético a través de inseminación artificial en búfalos ha sido mediocre en relación con el rebaño existente.

Para algunos autores la relación entre la baja resistencia de espermatozoides de búfalos sería un factor intrínseco vinculado a la especie dada su diferencia en la composición en comparación con los bovinos. Singh *et al* (1970) reportaron la existencia de una menor cantidad de ácido cítrico,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{++}$  y mayores cantidades de  $\text{Ca}^+$  y bicarbonato, y los mismos niveles de fructuosa, proteína antitripsínica (Pi) y el total de sustancias reductoras en el semen de búfalo en comparación

con el bovino. Para otros autores, los niveles de fosfatasa ácida tiene un efecto positivo sobre los espermatozoides de esta especie, mientras que la fosfatasa alcalina tendría un efecto perjudicial debido a que inhibirían la respiración y la viabilidad de las células espermáticas por un acúmulo de iones de fosfato inorgánico (Chaudhary *et al.*, 1977; Abdou *et al.*, 1978).

Aunque en algunas regiones del mundo los búfalos son estacionales, el macho de esta especie parece ser menos susceptible a esas variaciones; sin embargo, un aspecto importante en la calidad del semen es el estrés térmico. Las altas temperaturas, el manejo deficiente y una alimentación desbalanceada llevan al semen a ser deteriorado y perder calidad para congelar (Vale, 1994, 1997).

El inicio de la técnica de IA en el búfalo era ciertamente muy desestimulante en comparación con los bajos índices de fertilidad obtenidos. Los resultados fueron muy bajos debido a que los diluyentes utilizados para la criopreservación del semen eran los mismos utilizados en bovinos. Después del seminario sobre Reproducción e Inseminación Artificial,

1. Profesor en la Universidad Federal del Oeste de Pará (UFOPA). Santarém, Pará, Brasil.

promovido por la FAO y el gobierno sueco, en Karnal, India, 1979; varias mejoras se obtuvieron en diferentes laboratorios del mundo, que culminó con la existencia de tasas de nacimiento superiores al 65% (Sengupta y Sukhija, 1988).

Varios problemas ligados a los diluyentes fueron eludidos, principalmente a través de la utilización de TRIS (hidroxi-metil-amino-metano), TES (hidroxi-metil-amino-etano), leche descremada, LAICIPHOS 478, leche-citrato-lactosa, lactosa, citrato, ácido cítrico-suero de leche bufalina (Roy y Bhat, 1973; bhosrekar y Ganguli, 1974; Guenzel *et al.*, 1970; Avenell, 1982; Vale *et al.*, 1984; Tavel *et al.*, 1988; Stoyanov, 1991; Vale *et al.*, 1991; Vale, 1994).

En Brasil, particularmente en el Amazonas, la práctica de la IA, tanto en bovinos como en búfalos ya es una realidad pero aún necesita de estudios constantes, en especial sobre la utilización de nuevos diluyentes (Vale *et al.*, 1991a; 1991b).

Asimismo, los nuevos diluyentes continúan siendo investigados especialmente porque muchas de las sustancias utilizadas son importadas a un alto precio. Mientras algunos procedimientos para la conservación de esperma son relativamente simples, otros como la criopreservación se vuelven más complejos y requieren un conocimiento de la fisiología del aparato genital masculino y de la producción de espermatozoides, así como el uso de diferentes compuestos químicos que pueden servir como de sustratos, crioprotectores de agentes antimicrobianos, nutrición y protección a los espermatozoides durante las diferentes etapas del proceso, con el fin de obtener células viables en la post-congelación.

### **Morfología del sistema genital**

El aparato genital masculino de los búfalos es similar al de los bovinos pero las estructuras que lo componen son más pequeñas (Bhattacharya, 1974). Vale *et al.* (1981) encontraron para búfalos jóvenes de

peso entre cuatrocientos y seiscientos kilos. los testículos presentaron las siguientes medidas para peso, longitud y anchura para el testículo derecho e izquierdo 110,15<sup>a</sup>g, 8,83<sup>b</sup>cm, 4,64cm y 33g, 8,77cm, 4,58cm, respectivamente. En cuanto a las glándulas vesiculares, los mismos autores encontraron para la derecha e izquierda una longitud y anchura de 5,33cm, 1,96cm, 4,97cm, 1,87cm, respectivamente; la longitud y diámetro de las ampollas de los conductos deferentes, derecha e izquierda, midieron 9,36cm, 0,38cm, 9,27cm y 0,64cm, respectivamente. Estas medidas demostraron ser considerablemente bajas en comparación con los tamaños encontrados para *Bos taurus* como para *Bos indicus*, pero superiores a datos descritos para búfalos en otros países.

El pene también tiene una longitud y grosor menor que el de bovinos, con un promedio de 85,15cm y 1,95cm, respectivamente, el glande también se ha presentado menos desarrollado que en los bovinos, así como la vaina prepucial es menos larga y se adhiere a la pared abdominal, con la rara e incluso ausencia del orificio prepucial. Del mismo modo, el escroto de búfalo es menos voluminoso y presenta en la región inguinal una inserción más rectilínea en relación con el cordón espermático. Los bovinos que presentan una tendencia de formar una leve disminución en esta misma región. (Joshi *et al.* 1967; Maurya *et al.*, 1968; Osman y Fahmy, 1968; Fahmy y Osman, 1972; Bongs *et al.*, 1984; Bhosrekar, 1993).

Un parámetro importante para la evaluación andrológica del búfalo, con pocas citas en la literatura, se relaciona con la circunferencia escrotal (CE). Vale *et al.* (2004) trabajando con animales de la raza Murrah sometidos a un manejo adecuado, observaron que las medidas de CE son menores a las reportadas para bovinos y cebuinos. Para Bhosrekar (1993) la circunferencia escrotal para búfalos adultos indios varía entre treinta y cuatro centímetros.

Así como en el ganado vacuno, en búfalos de la raza mediterránea en Brasil se determinó que existe una alta correlación entre el peso corporal y la circunferencia escrotal ( $R^2=0,92$ ) y una correlación positiva entre la edad y el peso corporal ( $R^2=0,86$ ) (Vale *et al.* 2004) (figura 1). El peso corporal y la circunferencia escrotal son dos parámetros importantes utilizados en la evaluación de la capacidad reproductiva de los machos bovinos y bufalinos (Coulter *et al.*, 1975; Carter *et al.*, 1980; Ahmad *et al.*, 1984; Ohashi, 1993).

En toros jóvenes (un año para *Bos taurus* y dos para *Bos indicus*), la circunferencia escrotal en relación con el peso corporal y la calidad de semen ha sido presentada por varios autores como de gran importancia para la selección de animales con mayor potencial reproductivo, tanto en términos de producción, calidad y cantidad de semen y de la fertilidad en su conjunto. (Vale y Filho *et al.*, 1993).

En los búfalos machos es posible que el desarrollo corporal y del aparato genital de esta especie pueden alcanzar su pleno desarrollo en una forma similar a los bovinos y cebuinos, dependiendo de la presión de selección, del manejo de los animales desde el nacimiento, pasando por el destete y continuando por las diferentes

fases. Cabe señalar que dentro del manejo se debe tener en cuenta la profilaxis de las enfermedades parasitarias, prevención de enfermedades infecciosas y una dieta equilibrada.

### Tamaño del testículo, pubertad, madurez sexual y efecto de la edad sobre la reproducción

Mientras diferentes autores reportan que el macho bufalino presenta una baja precocidad en lo que se refiere a la reproducción, en la actualidad se sabe que ese aspecto está directamente relacionado a las deficiencias de manejo y de alimentación (Yassen y Mahmaoud, 1972; Ohashi *et al.*, 1988; Vale *et al.*, 2001; Vale *et al.*, 2004).

Al nacer, el testículo contiene muy pocas células de Leydig funcionales, mientras que en el lumen de los tubos seminíferos sí se encontraron células de sustentación o células de Sertoli, con la presencia de los gonocitos que dan origen a las espermatogonias. Aunque en esa fase infantil que empezará a la edad del destete, entre seis y ocho meses empieza gradualmente la secreción de gonadotropinas por la pituitaria (FSH y

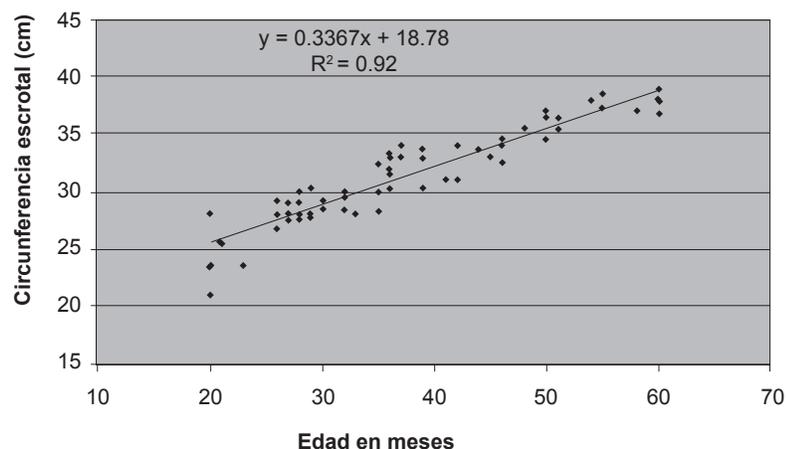


Figura 1. Presentación resumida de la regresión entre la relación de la circunferencia escrotal (cm) y la edad (meses) en machos de la raza Murrah. Fuente: Vale *et al.* 2004.

LH). Comenzando la secreción de hormonas sexuales masculinas principalmente la testosterona por las células de Leydig a partir de la fase final del proceso de espermatogénesis, cuando el animal posee entre diez y catorce meses cuando alcanza la pubertad.

Sin embargo, la pubertad en los machos bufalinos puede ser considerada como el tiempo en que el animal empieza la producción de espermatozoides. El inicio de la espermatogénesis coincide con el aumento de diámetro tanto de los tubos seminíferos como de su lumen. En esta fase ocurre también un rápido crecimiento de todo el sistema genital, cuando el animal muestra interés por la hembra y es entonces capaz de fecundar una o más hembras en celo.

Después de ese periodo, sigue la fase de madurez sexual, cuando el sistema genital llega a su producción plena de hormonas y espermatozoides, esta fase se alcanza entre los veintidos y veinticuatro meses de edad. En este periodo, la producción de espermatozoides alcanza los niveles normales con una producción plena de eyaculado con características deseables para la congelación. En este momento el animal alcanza su madurez sexual.

Es importante señalar que existe una marcada diferencia entre la morfología y el tamaño del sistema genital bufalino y las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*. La bolsa

escrotal del bufalino es menos voluminosa y presenta una inserción más rectilínea en relación con el cordón espermático y su fijación en la región inguinal, mientras que en los bovinos existe una tendencia de formar una leve disminución en esta misma región. De la misma manera la ausencia de una bolsa escrotal es evidente, el tamaño de los testículos, que es menor en comparación a los taurinos y el ganado cebú.

La circunferencia escrotal ideal para los sementales entre treinta y treinta y seis meses de edad de la raza Murrah está alrededor de  $30 \pm 3,6$  cm (24,4 a 31,9 cm), habiendo un crecimiento lineal y correlacionado con la circunferencia escrotal, el peso corporal y la edad del animal (Vale *et al.*, 2001; 2004) (cuadro 1).

Sin embargo, para la especie Carabao (*Bubalus bubalis* var. *Kerebau*), la pubertad y la madurez sexual es más tardía. De acuerdo con McCool *et al.* (1985) en Australia observaron que la circunferencia escrotal y el peso corporal presentaron una variación según la estación del año. En la estación seca ocurre una pérdida de peso de los animales, acompañado de un retraso del crecimiento o incluso una disminución de tamaño de los testículos sin cambio en los espermatozoides.

Los mismos autores, encontraron que los testículos maduraban a una edad de  $2,77 \pm 0,09$  años, con un peso corporal de  $275,6 \pm 8,5$  kilogramos y una circunferencia

Cuadro 1. Clasificación de la circunferencia escrotal en sementales bufalinos de raza Murrah.

Edad (meses)	Media (cm)	Muy bueno (cm)	Bueno (cm)	Cuestionable (cm)
12 - 17	$21 \pm 3,3$	>23	23	>19
18 - 23	$25 \pm 3,2$	>26	25	>21
24 - 29	$27 \pm 2,8$	>29	28	>23
30 - 35	$29 \pm 3,5$	>30	29	>25
36 - 41	$32 \pm 3,1$	>33	32	>28
42 - 47	$34 \pm 2,9$	>34	33	>30
48 - 53	$36 \pm 3,5$	>36	34	>31
54 - 60	$38 \pm 3,6$	>39	36	>32

Fuente: Vale *et al.* 2004.

escrotal entre veinte y veintiún centímetros. Otros autores, también encontraron una correlación positiva entre la edad, la circunferencia escrotal, el volumen testicular y el peso corporal en diferentes razas bufalinas (Bongso *et al.*, 1984; Ohashi, 1993).

Ohashi (1993), estudiando bufalinos lecheros de la raza Mediterránea, reportó que la pubertad se alcanza entre los diez y catorce meses de edad, con una circunferencia escrotal de  $21,7 \pm 1,9$  cm y la madurez sexual se alcanza a los veinticuatro meses de edad con  $31,1 \pm 2,9$  cm de CE. El mismo autor anotó que la pubertad no debe ser confundida con la madurez sexual. La pubertad debe ser definida como el tiempo de la primera capacidad de procreación, en cuanto la madurez sexual debe definirse como el tiempo en que el animal alcanza su potencial máximo de procreación.

### **Selección y examen clínico andrológico de sementales donantes de semen**

Para que un macho bufalino se convierta en donante de semen es muy importante el conocimiento de su progenie. Así, el primer aspecto en tomarse en cuenta para buscar un productor de semen es su valor zootécnico basado en una prueba de la progenie o de rendimiento. En América Latina el principal producto es la leche para la fabricación de Mozzarella u otros tipos de quesos finos, por eso, el conocimiento de la producción lechera de los ancestros del futuro donante de semen es de fundamental importancia.

Por otra parte, los animales seleccionados como donantes de semen deben haber tenido, desde el periodo pre-puberal, un tratamiento especial con respecto a su alimentación y un calendario preventivo contra enfermedades parasitarias infecto-contagiosas comunes en la región de

donde se originan, además deben estar bajo un adecuado manejo.

Una vez satisfechas esas exigencias iniciales, a los dieciséis o dieciocho meses el futuro reproductor puede ser enviado a un centro especializado para la congelación de semen. Antes de ir a ese centro, se deben realizar una serie de exámenes clínicos, andrológicos e higiénico-sanitarios, para comprobar que esté libre de trastornos reproductivos hereditarios o morfo-funcionales ligados al aparato reproductor, como la hipoplasia testicular, degeneración testicular, disfunción del epidídimo, ausencia o baja libido, así como enfermedades infecto-contagiosas, tales como: brucelosis, campilobacteriosis (vibriosis), BVD, IBR/IPV, tricomoniasis, leucosis, leptospirosis, tuberculosis.

Estos exámenes deben realizarse por un médico veterinario, que igualmente debe expedir el certificado de vacunaciones contra las diferentes enfermedades infecto-contagiosas que existen en la región, como es el caso de fiebre aftosa, carbón sintomático, rabia, etc.

En el centro especializado, el animal debe quedar en un periodo usual de cuarentena, recibiendo un manejo que consistirá en baños diarios durante las horas más calurosas, alimentación controlada desde el punto de vista proteico, forraje de buena calidad, además de suplemento mineral *ad libitum*.

Lo ideal es que el joven animal esté aislado en un puesto individual, aunque sea agrupado diariamente con los demás animales en un mismo lugar, donde se pueda observar la actividad homosexual de los mismos, de la misma manera se deben determinar la jerarquía y dominio entre ellos.

## **Entrenamiento de jóvenes sementales para la recolección de semen por el método de la vagina artificial**

El bufalino es quizás la especie doméstica más fácil en adaptarse y ser capacitados para servir en la vagina artificial. Para ello, es importante observar el comportamiento de los machos jóvenes, incluso antes que lleguen a la pubertad, por la existencia de una intensa actividad homosexual entre machos jóvenes, incluido el dominio de un macho en un grupo en particular (Anand, 1979; Vale, 1994; 1997).

Una vez identificada la preferencia de un determinado animal por otro, se deben escoger los dominados, colocarlos en un cepo de monta y dejar al dominador hacer montas falsas, teniendo cuidado de desviar el pene sin tocarlo y sin la presencia de la vagina artificial. Una vez entrenado el macho, generalmente eyaculará en la vagina artificial en el primer intento.

Cabe señalar que el comportamiento sexual de los búfalos en comparación con los bovinos europeos es más débil, asemejado a los cebuinos. El bufalino joven puede ser condicionado para saltar un macho o una hembra, aunque el tiempo de reacción sexual y libido son mucho más débiles. Atributos como el volumen del semen, la concentración, la actividad de masas y fuerza tienen poca variación cuando se compara con los bovinos y los cebuinos (Vale, 1994, 1997).

## **Comportamiento sexual**

El macho de la especie bufalina tiene un comportamiento sexual similar a la del *Bos taurus* y del *Bos indicus*, pero la libido sexual es menos intensa. La habilidad sexual sigue una cadena de acciones como cortejo, erección, potrusión del pene, monta, con rítmicas arremetidas pélvicas, introducción del pene en la vagina, eyaculación caracterizada por la

estocada final, desmonta y el periodo de calma y tranquilidad.

Dentro de esta cadena, el cortejo es quizás la fase más larga, que oscila entre los diez o quince minutos o más, se requiere mucha paciencia para que el animal se acostumbre al maniquí, que preferentemente frente a otro macho, en el caso de animales jóvenes, o una vaca en el caso de machos adultos.

## **Recolección, procesamiento y congelación del semen para su uso en la inseminación artificial**

La utilización del semen congelado como herramienta para el mejoramiento genético de los búfalos fue iniciada por Bhattacharya y Srivastava (1955) en la India cuando la Inseminación Artificial (IA) fue por primera vez realizada utilizando semen congelado en pastillas y ampollas. En seguida, varios trabajos tuvieron continuidad, no solo en ese país, sino en otros (Roy *et al.*, 1956; Basirov, 1964; Sahana y Roy, 1972; Heuer, 1980).

Sin embargo, el desconocimiento de una tecnología adecuada para la especie bufalina, en lo que concierne a los diluyentes, concentración de glicerol, tiempo de equilibración, métodos de congelación y falta de un protocolo, llevó a resultados pobres y variables.

Hoy se sabe que esas fallas ocurrieron por intentar utilizar en el procesamiento tecnológico del semen bufalino la misma metodología utilizada para el semen de bovinos. Por esta última razón, la utilización de la metodología para la congelación del semen bovino aplicada a los bufalinos lleva a fracasos, se debe entonces, utilizar una tecnología propia para esa especie que llevará a resultados satisfactorios.

Para algunos autores, la baja resistencia de los espermatozoides del macho bufalino sería un factor intrínseco ligado

a la especie, debido a su diferencia en composición cuando se compara al semen del bovino.

### **Características del eyaculado para ser congelado**

El semen del semental bufalino puede presentar problemas asociados con los factores climáticos o estacionales, como consecuencia de la gran sensibilidad del epitelio seminífero al aumento de la temperatura ambiental. En el caso de temperatura tropical como la región Amazónica y del Brasil Central hay necesidad de implementar un manejo especial, con acceso a lagunas o baños diarios en las horas más calientes, aspecto de fundamental importancia, para atenuar los efectos detrimentales del calor.

Por ser más sensibles al calor, debe darse especial atención a los animales sometidos a recolección de semen durante la estación caliente del año. Es muy importante la protección de los animales contra el estrés térmico, proporcionando el acceso libre del animal a baños y sombras, puesto que el bufalino tiene dificultades de disipar el calor corporal al poseer menos glándulas sudoríparas y por lo tanto un sistema termoregulador menos eficiente, al compararlo a los bovinos cebuinos (Shafie, 1994; Vale, 1994; 1997).

Así, el mejor horario para la recolección del semen bufalino es en el inicio del día (aún oscuro) o al final del atardecer, puesto que esta especie presenta un comportamiento sexual nocturno. En el momento de la recolección del semen, hay necesidad de que el ambiente sea tranquilo, sin ruido u otras actividades que puedan causar una pérdida de concentración en los reproductores que van a donar semen.

La higiene del local para la recolección del semen, así como todo el material utilizado en el procesamiento tecnológico del mismo, es de fundamental importancia para el éxito del proceso. Todo el material

utilizado como vaginas artificiales, vidriería, equipo de procesamiento etc., deben ser esterilizados o sometidos a procesos previos de descontaminación adecuada, inclusive los diluyentes, que deben ser preparados con una anticipación mínima de veinticuatro horas.

De la misma forma, para una mejor calidad del eyaculado, se debe usar la vagina artificial no lubricada, a una temperatura entre 44-45°C. Cada sesión de recolección consistirá de dos eyaculados, con un intervalo de mínimo 30 minutos. La utilización de montas falsas con desvío del pene, son recomendadas para mejorar la calidad del eyaculado.

Después de la recolección, el eyaculado debe ser evaluado para los parámetros mínimos establecidos y colocado en baño maría a una temperatura de 37 ° C (Vale, 1994; 1997).

### **Color y densidad**

Tanto el color como la densidad dependen de la concentración o número de células espermáticas en el eyaculado. Así, el color y la densidad reflejan la concentración del eyaculado. En general, el color normal del semen bufalino varía entre blanco lechoso a blanco cremoso, y una vez colocados contra a luz artificial, presenta rayas con color azul oscuro (Vale, 1994; 1997).

### **Volumen**

Las variaciones de volumen pueden ser observadas tanto en el caso de los toros jóvenes como adultos. Hemos observado que los animales jóvenes en la pubertad y en el inicio de la madurez sexual el volumen del semen puede variar entre 1 a 3 ml, pero este puede alcanzar volúmenes entre 4-8 ml después de alcanzar la madurez sexual. Se debe prestar atención en los casos de degeneración testicular, por lo general causada por estrés térmico producido por el calor del medio ambiente, cuando no solo el volumen sino otras características

físicas y morfológicas del semen tienden a sufrir modificaciones.

Para Vale (1994 y 1997) el eyaculado de bufalinos presenta las siguientes características físicas y morfológicas, como se presenta en el cuadro 2.

### Movimiento de onda o en masa

El movimiento de onda o en masa se genera directamente por la concentración y la movilidad de los espermatozoides existentes en el eyaculado. Ese movimiento conjunto se hace luego de la colocación de una gota del eyaculado en un portaobjetos y la observación en el microscopio con un menor aumento de 10x, luego se puede hacer una evaluación de este fenómeno

dentro de una escala de 0 a 5, de acuerdo con el cuadro 3, eyaculados con una escala numérica de 3 a 5 son apropiados para la congelación.

### Concentración

La concentración de los espermatozoides del semental bufalino normal presenta una variación entre  $0,6 \times 10^6$  a  $1,2 \times 10^6$   $\text{mm}^3$ . Ese parámetro está directamente correlacionado con los aspectos genéticos, estacionales, nutricionales y de manejo. La concentración de los espermatozoides de un eyaculado es estimada por el número de células por  $\text{mm}^3$  del volumen del semen. Así, como en las otras especies domésticas, existen diferentes métodos utilizados para la determinación

Cuadro 2. Características del eyaculado del semental bufalino obtenido mediante la vagina artificial.

Característica	Padrón normal
Color	Blanco, blanco-lechoso, con estrías oscuras-azules
Volumen	3 ml ( 2 \ 8 )
Turbidez	>3
Motilidad (%)	>70
Vigor (motilidad individual)	>3
Concentración	$6 \times 10^6$ al $12 \times 10^6$ espermatozoides por ml
Células espermáticas vivas (%)	>70
Patología espermática (%)	<30
pH	6,7 al 7,5

Fuente: Vale (1994; 1997)

Cuadro 3. Escala para la evaluación microscópica de la turbidez del semen bufalino.

Parámetro	Escala numérica	Característica microscópica del semen
Muy pobre	0	Ausencia de ondas, con los espermatozoides inmóviles
Pobre	1	Ausencia de ondas, con pocos espermatozoides móviles
Medio	2	Raras ondas son observadas, con algunos espermatozoides móviles
Bueno	3	Presencia de ondas, movimiento de espermatozoides moderado
Muy bueno	4	Presencia de ondas rápidas y distintas, con oscurecimiento del campo
Excelente	5	Presencia de múltiples ondas en todas direcciones, con intenso oscurecimiento del campo

Fuente: Vale (1994; 1997)

de la concentración espermática, los más utilizados rutinariamente son el de la cámara hematimétrica o el de la fotocolorimetría.

El primer método es muy simple, ya que utiliza una pipeta de Sahli o una pipeta de Eppendorf automática, con graduación para 20 µl, que será diluido en un frasco conteniendo 4 ml de una solución de formol-salino tamponada a 1% o de citrato de sodio tamponado lo que dará una dilución final de 1:200. luego, el semen inmediatamente se guarda en un refrigerador a una temperatura de 4° C hasta ser analizado.

Después de una leve y rápida homogeneización del semen diluido, una gota es llevada a una cámara de Neubauer y se realiza el mismo procedimiento usado para el conteo de células sanguíneas. Un total de cinco cuadrados son contados, el resultado es multiplicado por 10.000 para la obtención de la concentración total

de espermatozoides del eyaculado (Vale, 1994; 1997).

## Motilidad

La motilidad espermática es un valor fundamental para la conclusión de la calidad de un eyaculado. Debe ser realizada inmediatamente después de la evaluación del movimiento macroscópico. Colocar una gota pequeña de semen entre un portaobjetos a 40° C, examinar al microscopio con un aumento de 40 ó 100x, de acuerdo con la escala del cuadro 4.

## Vigor

El vigor de la motilidad individual y la evaluación del tipo e intensidad del movimiento individual se realiza entre porta y cubreobjetos a 40° C, con un aumento de 40 a 100x en un microscopio, como se presenta en el cuadro 5.

Cuadro 4. Escala para la evaluación microscópica de la motilidad del semen bufalino

Motilidad (%)	Evaluación	Valor numérico
80 – 100	Muy buena	5
60 – 80	Buena	4
40 – 60	Media	3
20 – 40	Pobre	2
0 – 20	Mala	1

Fuente: Vale (1994; 1997)

Cuadro 5. Escala para la evaluación microscópica del vigor del semen bufalino

Vigor	Descripción
5	Todos o casi todos los espermatozoides con enérgicos movimientos progresivos
4	La mayoría de los espermatozoides con rápidos movimientos progresivos
3	Espermatozoides con movimientos progresivos de intensidad regular y movimientos oscilatorios
2	Algunos espermatozoides con movimiento progresivo vigoroso y mucho movimiento oscilatorio
1	Solamente espermatozoides con movimiento oscilatorio
0	Todos los espermatozoides se encontraban inmóviles

Fuente: Vale (1994;1997)

## Vivos y muertos

Mediante la determinación del número de espermatozoides vivos y muertos es posible predecir la calidad de un eyaculado. Un eyaculado que presenta más de 30% de espermatozoides muertos, difícilmente servirá para ser procesado y congelado. El procedimiento para la coloración para vivos y muertos es el siguiente:

- Colocar una pequeña gota de semen fresco, retirado del eyaculado después de la recolección. Colocarlo sobre un portaobjetos limpio y calentado a 37 °C;
- Colocar dos gotas del colorante Eosina a 2%, mezclar ambos líquidos con un tubo de vidrio;
- Dejar reposar por 30 segundos y proceder a realizar un frotis en un segundo portaobjetos;
- Secar el portaobjetos sobre una fuente de calor o aire caliente;
- Examinar al microscopio

Los espermatozoides vivos presentaran una coloración clara o no se dejan colorear, mientras que los muertos tendrán una coloración rosa-ceniza, debiéndose

considerar los espermatozoides parcialmente coloreados como muertos.

## pH

El semen normal del búfalo colectado a través de la vagina artificial, presenta un pH que varía entre 6,5 a 7,2. El pH debe ser determinado inmediatamente después de la recolección, por medio de papel indicador. Es importante destacar que el semen bufalino tiene una tendencia más fuerte a acidificarse, más aun, si tiene una concentración mas baja de azúcares. Luego de la recolección ocurre un rápido metabolismo de esos azucares que son transformados en ácido láctico, con una disminución del pH del semen, ocasionando alteraciones irreversibles de los espermatozoides.

## Características bioquímicas del semen

Los aspectos relacionados con la composición bioquímica integral del semen bufalino y del plasma seminal son importantes para el buen conocimiento de las aplicaciones de las técnicas de congelación en esa especie.

Cuadro 6. Algunas características físicas y bioquímicas del semen bufalino y del plasma seminal.

Característica	Semen total	Plasma seminal
Osmolaridad (mosM/kg)	293,33±3,39	283,75±2,31
Proteína total (g/100 ml)	3,10±0,10	2,86±0,14
Lípidos totales (mg/100 ml)	321,15±18,41	260,86±12,52
Fructosa (M <sup>g</sup> /100ml)	547,08±61,24	684,60±81,14
Ácido cítrico (mg/100 ml)	368,73±14,82	466,33±31,66
Sodio (mg/100 ml)	260,63±8,81	258,58±13,65
Potasio (mg/100 ml)	153,50±2,68	154,83±3,27
Calcio (mg/100 ml)	32,04±2,77	32,42±3,10
Magnesio (mg/100 ml)	6,17±0,41	6,46±0,39
Clorados (mg/100 ml)	196,57±2,45	224,06±2,60
Fosfatos inorgánicos (mg/100 ml)	17,02±1,67	12,75±1,09
Fosfatasa ácida (U/100 ml)	225,00±2,99	331,20±2,60
Fosfatasa alcalina (U/100 ml)	326,05±2,16	331,20±2,60
Zn (mol/célula e μmol/l)	14,3	86,88

Fuente: Ibrahim et al. (1985)

Singh et al (1970) reportaron la existencia de una menor cantidad de ácido cítrico, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Mg<sup>++</sup> y mayores cantidades de Ca<sup>+</sup> y bicarbonato, y niveles iguales de fructosa, Pi y sustancias reductoras totales en el semen de bufalino cuando se compararon al de bovino.

Para otros autores, los niveles de fosfatasa ácida tienen un efecto positivo sobre los espermatozoides de esa especie, mientras que la fosfatasa alcalina, tendría un efecto deletéreo, dado que altos niveles de fosfatasa inhiben la respiración y la viabilidad de las células espermáticas, debido a un acumulo de iones de fosfato-inorgánicos (Chaudhary et al., 1977; Abdou et al., 1978).

### Examen de la morfología de los espermatozoides

El porcentaje de espermatozoides normales en el eyaculado de un bufalino es un punto importante que debe ser observado cuando el objetivo es la congelación de semen. Es importante asociar los otros parámetros ya evaluados en el eyaculado, tales como turbidez, motilidad y vigor directamente relacionados con el número total de espermatozoides normales y anormales. El estudio morfológico de las células espermáticas es realizado a través de preparaciones sobre portaobjetos, las células son coloreadas en un montaje húmedo.

Entre los métodos de coloración se puede usar el de Williams (carbo-fucsina-eosina) y el método Cerovsky (rojo Congo), cuando se cuentan doscientas células bajo aceite de inmersión en un microscopio convencional de luz brillante, con un aumento de mil a dos mil veces. En el caso de la preparación húmeda, consiste en retirar del recipiente con solución de formol-salino con dos gotas de semen ya diluido después de la recolección, teniendo el cuidado de hacer una leve homogeneización del frasco, y colocar una gota en el portaobjetos calentado a

40°C y cubrirla con un cubreobjetos, y se examina la preparación en el microscopio de contraste de fase o interferencia. En ambos métodos cerca de doscientas células deben ser contadas.

Las diferentes tipos de anomalías estructurales asociadas con alteraciones morfológicas de la cabeza, acrosoma, pieza intermedia, cola, gotas citoplasmáticas, además de otras estructuras extrañas al semen normal, tales como células de la línea espermátogénica, prepucciales, sanguíneas, inflamatorias, deben ser observadas y contadas, cuyos porcentajes junto con el de los otros parámetros ya mencionados, componen el espermiograma.

Las alteraciones encontradas deben seguir la clasificación propuesta por Blom (1972) para bovinos, divididas en defectos mayores y menores.

Defectos mayores	Defectos menores
Subdesarrollado	Cabeza delgada
Cabeza aislada patológica	Pequeña normal
Estrechamiento en la base	Gigantes, cortos y largos
Cabeza piriforme	Cola doblada y enrollada
Contorno anormal	Pieza intermedia abaxial, retroaxial
Cabeza pequeña anormal	Gota citoplasmática proximal y distal

Los límites para defectos mayores, individual y total deben ser de:

Individual - 5%  
Total - 20%

Los límites totales para defectos mayores y menores aceptables para el semen bufalino con una concentración de 40 millones por dosis es de 30% de patología total (Vale, 1994;1997).

## Patología del acrosoma de los espermatozoides post descongelación

El procesamiento tecnológico del semen puede provocar alteraciones significativas en la osmolaridad del medio diluyente de los espermatozoides y afectar especialmente el acrosoma, tanto durante el proceso de la congelación como de la descongelación (Singh et al., 1995; Vale, 1994). Por eso, es recomendable antes del empleo de una partida de semen congelado, que sea haga una evaluación de la integridad del acrosoma de los espermatozoides congelados.

Esa técnica presenta dos procedimientos, puede ser hecha a través de un frotis coloreado o una preparación húmeda. En el primer caso, se prepara un frotis en un portaobjetos limpio, desengrasado y calentado a 40°C de semen descongelado, secando la muestra de la misma forma

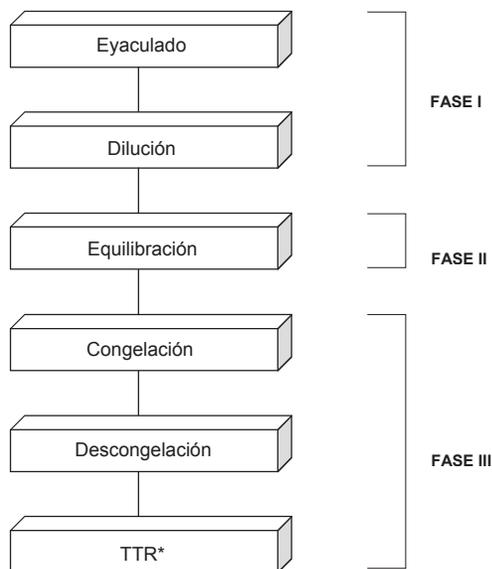


Figura 2. Representación esquemática de la rutina utilizada en las diferentes etapas del procesamiento tecnológico para la congelación de semen bufalino.

\* Test de Termoresistencia.

que se hace para la coloración de vivos y muertos, colorear seguidamente con colorante de Giemsa y con el portaobjetos examinar en el microscopio con el mismo procedimiento para la técnica de la determinación de vivos y muertos. En el caso de la preparación húmeda, se toma una muestra de semen descongelado, con dos a tres gotas que son previamente diluidas en una solución salina con formalina al 4%, haciendo en seguida una leve homogeneización. Inmediatamente se retira una gota de semen diluido en el portaobjetos, cubrir con el cubreobjetos y examinar en el microscopio invertido en contraste de fase, con un aumento de 1000x.

En ambas técnicas serán investigadas las siguientes alteraciones relacionadas con el acrosoma: acrosoma separado, acrosoma con desprendimiento, acrosoma edematizado, acrosoma roto. Después de ese examen, cualquier partida de semen congelado que presente más del 50% de esos defectos, debe ser descartado por no ser apto para su uso en IA (Vale et al., 1991a; Vale, 1994; 1997).

## Procesamiento tecnológico para a congelación del semen

El principio básico para la congelación de semen bufalino es semejante al de cualquier otra especie, y se presenta en la figura 2.

### Diluyentes

Actualmente, los innumerables diluyentes utilizados en la criopreservación de semen bufalino son citrato-yema de huevo, lactosa, leche descremada, suero de leche, TRIS-yema y más recientemente, el diluyente a base de TRIS (Tris-hidroximetil amino metano), cuya composición se presenta en el cuadro 7, mientras que el cuadro 8 presenta la fórmula del TES (Tris-hidroximetil amino etano), siendo el glicerol al 7% el crioprotector común

Cuadro 7. Fórmula del diluyente TRIS

TRIS (Hidroxi-metil-amino-metano)	Cantidad
Solución-madre	
Tris	38,10g
Ácido cítrico	19,70g
D-fructosa	15,50g
Sulfato de estreptomicina	1,00g
Penicilina G potásica	5 x 10 <sup>5</sup> UI
Agua bidestilada c.s.p.	1000 ml
Dilución final (en %)	
Solución- madre	73
Glicerol	7
Yema de huevo fresco	20

Cuadro 8. Fórmula del diluyente TES

TES (Hidroxi-metil-amino-etano)	Cantidad
Solución-madre (parte I)	
TES	48,30g
TRIS	11,60g
D-fructosa	2,00g
Sulfato de estreptomicina	2,00g
Penicilina G potásica	1 x 10 <sup>6</sup> UI
Água bidestilada c.s.p.	1000 ml
Solución-madre (parte II)	
Leche descremada	11g
Agua bidestilada	100 ml
Dilución final (en %)	
Solución-madre (parte I)	36.5
Solución-madre (parte II)	36.5
Glicerol	7
Yema de huevo fresco	20

a todos los diluyentes (Vale, 1994; 1997). Gran parte de esos diluyentes están constituidos de sustratos orgánicos industrializados, productos importados de eficiencia comprobada, pero de alto costo y de difícil adquisición lo que muchas veces encarece el proceso tecnológico.

Así, han surgido otras alternativas como la utilización de agua de coco, empleada en bovinos por Chieffi & Masoti (1959) y por Nunes (1998) en diferentes animales domésticos, incluso en la especie humana.

Vale et al., (1984), congelaron por primera vez con éxito en Brasil semen bufalino utilizando diluyentes a base de tris (tris-hidroximetil amino metano) y tes (tris-

hidroximetil amino etano). El semen congelado presentó una motilidad después de la descongelación superior a 40% y un vigor 3 y cuando fue usado en el campo en programas pilotos, presentó una fertilidad comprobada a través del porcentaje de nacimiento superior al 57%.

Nuevamente Vale et al. (1997; 1999) utilizaron como alternativa un diluyente a base de agua de coco, siguiendo las recomendaciones de Nunes (1998), obteniendo resultados satisfactorios, tanto en el laboratorio, como en pruebas de IA en campo, con índices de fertilidad semejantes a los otros diluyentes tradicionales que se presentan en los cuadros 9 y 10.

Cuadro 9. Composición del diluyente CEBRAN I a base de agua de coco

Solución Stock I	Cantidad
Agua de coco	50 ml
Agua bi-destilada	25 ml
Citrato de sodio 5%	25 ml
Solución Stock II	
Solución stock I	90 ml
Yema de huevo	10 ml
<b>Diluyente Final</b>	
Solución stock II	93,0 ml
Glicerol	7,0 ml
Penicilina G potásica	1,000UI/ml
Sulfato de estreptomina	2 g/100 ml
(Ajustar o pH para 6,8 –7,0)	
Ajustar osmolaridad a $290 \pm 5$ mosM	

Cuadro 10. Fórmula del diluyente CEBRAN II a base de Ringer-Lactato

Solución A (500 ml)	Cantidad
D-Fructosa	1,08 g
Penicilina G potásica	70 mg o 1000 UI
Sulfato de estreptomina	700 mg/ $10^5$ UI
<b>Ringer-Lactato c.s.p</b>	500 ml
Solución B	
11% leche descremada diluida en agua a 80° C	
<b>Solución Final</b>	
Solución A	36,5 ml
Solución B	36,5 ml
Glicerol	7,0 ml
Yema de huevo	20,0 ml
(Ajustar el pH para 6,8 7,0)	
Ajustar la osmolaridad a $290 \pm 5$ mosM	

## Dilución

Posterior a la recolección, el semen debe ser rápidamente pre-diluido con el diluyente mezclado lentamente con la ayuda de una pipeta en un recipiente del tipo biberón o Erlenmeyer con un volumen de veinte a cuarenta milímetros. Tanto el semen como el diluyente deben estar a temperatura de 37° C, por eso deben estar sumergidos en un baño maría a la misma temperatura. Es muy importante que el diluyente sea adicionado gota a gota al semen, hasta alcanzar el volumen para una concentración de 40 x

$10^6$  espermatozoides/dosis. Al final de la dilución se debe proceder a una evaluación de la motilidad y del vigor, antes de que sea envasado el semen en pajuelas de 0,5 ml, previamente identificadas con el nombre, número de toro, fecha y número de lote.

## Refrigeración y tiempo de equilibrio

Después del envasar el semen en las pajuelas estas se deben colocar en un refrigerador y sometidas a una curva decreciente de

temperatura de 0,25 °C/minuto, hasta alcanzar la de 5°C. El tiempo de equilibrio ideal para el semen bufalino es de seis horas, debiéndose valorar el semen al final del tiempo de equilibrio antes de continuar con el proceso de congelación.

### Congelación

La congelación del semen debe hacerse inicialmente en vapor de nitrógeno líquido, manteniendo las pajuelas por veinte minutos horizontalmente sobre una rampa localizada a cuatro centímetros por encima del nivel de nitrógeno. Después de este periodo, el material debe ser sumergido directamente en el nitrógeno líquido, distribuidos en los vasos criogénicos y almacenarlas hasta su utilización.

### Evaluación del semen después de la descongelación

Luego de la congelación y antes de que una partida de semen sea almacenada en un contenedor apropiado, es necesario la descongelación de una dosis de semen para evaluar su motilidad y vigor. Esa descongelación debe ser hecha en agua a 40°C por treinta segundos. Por tanto, para que una partida de semen congelado sea aceptada en el uso de programas de IA, debe presentar una motilidad mínima de 30% y un vigor 2-3. La evaluación de semen debe hacerse de la misma forma que se hace la del semen recién recolectado a través de la vagina artificial.

Cuadro 11. Fórmula de la solución de PBS

Solución del PBS	Contenido
NaCl	8,000g
KCL	0,200g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,100g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,100g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,150g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,200g
H <sub>2</sub> O bidestilada q.s.p.	1000 ml

También es recomendable realizar una evaluación microscópica de las muestras de semen, después de la congelación, principalmente para la observación de las alteraciones acrosómicas de los espermatozoides. Se debe hacer una dilución de semen en una solución de PBS (tampón fosfato salino), (cuadro 11). Este procedimiento busca facilitar la evaluación de la calidad de semen, porque el diluyente a base de TES hace difícil la visualización de los espermatozoides, mientras que la solución con PBS facilita su visualización. La solución puede ser preparada y almacenada a - 20°C, de acuerdo con la fórmula abajo descrita.

### Test de termoresistencia (TTR)

Después de transcurrido un mínimo de treinta días de almacenamiento en nitrógeno líquido. Cada lote de semen deberá contar con un mínimo de tres dosis escogidas al azar, que serán descongeladas en baño-maría a 40°C por treinta segundos. Una muestra deberá ser separada e incubada durante tres a cinco minutos en baño maría a 40°C, para tener el semen disponible a los exámenes inmediatos pos-descongelación. Para el test de termoresistencia las dosis de semen permanecerá en incubación en baño-maría a 40°C, realizando nuevas evaluaciones a los treinta, sesenta, ciento veinte y ciento ochenta minutos. En el test termoresistencia el semen tiene que presentar un mínimo de 20% de motilidad a los ciento ochenta minutos de incubación (Ribeiro et al., 1991).

### Bibliografía

- Abdou, M.S.S; El-Guindi,M.M; El-Menoufy, A.A; Zaki, K. (1978) *Enzymic profile of the semen of bovines (Bubalus bubalis and Bos taurus)*. II. Parellelism between acid and alkaline phosphatases and various measures of semen quality. Zbl. Vet. Med., A, 25:222-230.
- Dhami, A.J; Jani, V.R; Mohan, G; Sahni, K.L. (1994) *Effect of extenders and additives on freezability, post-thaw thermoresistance and*

- fertility of frozen murrh buffalo semen under tropical climate*. Buffalo Journal. p.35-45.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (1999) FAOSTAT – Agriculture data (en línea). Disponible en: <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture/>
- Masotti, N. (1964) *Estudo da conservação e fecundação de sêmen de touros diluído em soro de leite de soja (Glicyne soja)*. TESE. Pirassununga, SP. 103p.
- Misra, A.K; Patel, S.H; Joshi, B.V; Jaiswal, R.S; Trivedi, K.R. (1994) *Buffalo semen characteristics and its freezability under indian conditions*. Proceedings 14th World Buffalo Congress, Vol. III, SP, Brazil. p. 495-497.
- Mohan, G; Sahni, K.L. (1991) *Comparative efficacy of certain extenders containing various levels of yolk for preservation of buffalo semen at 5°C*. Indian Journal of Animal Sciences. 61(7) p.725-727.
- Nahúm, B. de S; Ohashi, O.M. (1997) *Preliminary report on the use of coconut water (Cocus nucifera) as a diluter of buffalo semen*. Proceedings 5<sup>th</sup> World Buffalo Congress. p.836-839.
- Nunes, J.F. (1987) *Artificial Insemination in Goats*. International conferences on Goats, 4- Brasília- Proceedings p. 733-743.
- Nunes, J.F. *Utilização da água de côco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos*. TESE para prof. Titular.
- Nunes, J.F. (1998) *Utilização da água de côco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem*. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 22(2):109-112
- Nunes, J.F. Combarous, J. (1995) *Utilização da água de côco e suas frações ativas como diluidor de sêmen nos mamíferos domésticos*. Revista Ciência Animal. Jan/Dez.Fortaleza. 5(1/2):15-21.
- Nunes, J.F; COMBARNOUS, J. (1996) *Utilização da água de côco e suas frações ativas na conservação "in vitro" e avaliação "in vivo" do sêmen da espécie caprina*. XXIV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. p.118.
- Nunes, J.F; Salgueiro, C.C. de M. (1999) *Utilização da água de côco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos*. Rev. Cient. Prod. Animal. 1(1):17-26.
- Nunes, J.F; Salles, M.G.F. (1993) *El agua de coco (Cocus nucifera) "in natura" integral y adicionada com citoquininas, como dilutor de semen caprino*. Revista Científica. 3(3):273-278.
- Rahman, A.; Dutta, J.C; Rajkonwar,C.K. (1988) *A study on preservation of buffalo semen in two extenders*. Buffalo Journal. 1:57-60.
- Ribeiro, H.F.L. (1993) *Inseminação artificial em búfalos (Bubalus bubalis) com sêmen importado*. Anais X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. 2:266.
- Singh, B; Mohan, G; Sahni, K.L. A. (1992) *Comparative study on the osmotic pressure of buffalo and cattle seminal plasma*. Indian Journal Animal Science. 62:1055-1056.
- Sigh, B; Sahni, K.L; Mohan, G. (1995) *Effect of osmolality of extender on freezing of buffalo semen*. Indian Journal Animal Science. 65: 65-66.
- Vale, W. G. (1999) *Perspectivas da bufalinocultura no Brasil e na América Latina. Bubalinos: sanidade, reprodução e produção*. V. H. Barnabé, H. Tonhati & P. S. Baruselli, Editores. FUNEP, Jaboticabal. 1-26 p.
- Vale, W. G. (1997) *Sperm cryopreservation. Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy*. In: *Bubalus bubalis* - Journal Buffalo Science and Technique, suppl. 4:129-140.
- Vale, W.G. (1994) *Collection processing and deep freezing of buffalo semen*. Buffalo Journal. p. 65-81.
- Vale, W.G; Nahúm, B. de S; Silva, A.O.A; Sousa, J.S; Souza, H.E.M; Ohashi, O.M; Ribeiro, H.F.L. (1999) *Inseminação artificial em búfalos com sêmen congelado em diluente a base de água de côco (Cocus nucifera)*. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 23(3):354-356.
- Vale, W.G; Ohashi, O.M; Ribeiro, H.F.L; Sousa, J.S. (1991a) *Semen freezing and artificial insemination in the water buffalo in the amazon valley*. Buffalo Journal, Bangkok, 7(2):137-144.
- Vale, W.G; Ohashi, O.M; Ribeiro, H.F.L; Sousa, J.S. (1991b) *Present status of research and development activities on water buffalo reproduction in Brazil specially in the amazon valley*. Proceedings of third world buffalo congress, Bulgaria, Varna, p.7-13.
- Vale, W.G; Ribeiro, H.F.L; Sousa, J.S; Ohashi, O.M. (1984) *Inseminação artificial em búfalos (Bubalus bubalis) na região amazônica*. XXI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Belém-Pa, p.91.