

Evaluación integral de la calidad seminal bovina: valor agregado para la inseminación artificial a tiempo fijo

Fischman ML¹; Gonzalez L¹; Ghirardosi MS¹; Torres P¹; Malcervelli D¹; Fratto MC¹;
Mazzeo R²; Monti JI²; Cisale H¹

¹Cátedra de Física Biológica, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción
Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

²Centro de Inseminación Artificial de Venado Tuerto (CIAVT), Santa Fe, Argentina

Resumen

La inseminación artificial bovina ha sido la técnica de reproducción asistida de mayor difusión por las ventajas que presenta en el mejoramiento genético, la prevención y control de enfermedades de transmisión sexual, la posibilidad de emplear toros con facilidad de parto y la optimización del manejo reproductivo del rodeo. La Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) suma beneficios tales como evitar la detección de celo, acortar el período de anestro post-parto y concentrar los partos en un período breve. El éxito de la IATF depende de múltiples factores entre los que se encuentra la calidad seminal. Ningún examen de semen in vitro presenta una correlación alta con la fertilidad, por lo cual debe desarrollarse un protocolo de control de calidad que estudie el mayor número posible de características de los espermatozoides. La selección de mejores muestras para IATF permitiría evitar la repetición en las inseminaciones o el repaso con monta natural. El objetivo del presente trabajo es encontrar indicadores seminales, a través de los análisis de rutina y del núcleo espermático, que estén asociados con tasas de preñez elevadas para IATF y permitan predecir el comportamiento de las dosis a campo. Se tomarán muestras aleatorias de cada partida de las dosis seminales congeladas ad hoc y se realizará el control de calidad espermático de rutina y el control nuclear. Se evaluarán: parámetros de motilidad espermática obtenidos por análisis computarizado (CASA), morfología, viabilidad, integridad acrosómica y funcionalidad de la membrana espermática. La evaluación del núcleo espermático incluirá: morfología nuclear, maduración de la cromatina, decondensación y fragmentación nuclear. Esta última, se realizará a través de una prueba desarrollada en nuestro laboratorio (FCV-UBA). Los

responsables del CIAVT seleccionarán los establecimientos donde se realizarán los protocolos de IATF, así como los profesionales responsables de implementarlos, quienes recolectarán los resultados de preñez a campo. Sobre la base de estos resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo y la experiencia de campo de los responsables del CIAVT, se espera encontrar asociación entre algunos de los parámetros seminales analizados y los porcentajes de preñez obtenidos por la técnica de IATF. Este proyecto intenta encontrar la existencia de indicadores de clasificación de fertilidad y de pérdidas embrionarias tempranas, lo que permitiría realizar una selección de los individuos más aptos para ser empleados como donantes para IATF. De esta forma, se podrían comercializar muestras de semen especialmente seleccionadas, con el valor agregado que esto conlleva.

Palabras claves: IATF, análisis espermático, evaluación nuclear

1. Introducción

La inseminación artificial (IA) bovina ha sido la técnica de reproducción asistida de mayor difusión por las ventajas que presenta en el mejoramiento genético, la prevención y control de enfermedades de transmisión sexual, la posibilidad de emplear toros con facilidad de parto y la optimización del manejo reproductivo del rodeo.

La Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) es la alternativa más útil para aumentar el número de animales inseminados, presentando beneficios tales como (Fioretti, 2006):

- Evitar la detección de celo.
- Acortar del período de servicio, el cual puede ser aplicado en la mejor época del año de acuerdo al estado de los potreros y al calendario comercial.
- Minimizar el período de anestro post-parto.
- Concentrar los partos en un período breve para lograr una mayor uniformidad en la producción.

Existen factores que condicionan el éxito de la IATF. Estos pueden ser divididos en factores inherentes al animal (edad, raza, número de partos, nutrición y condición corporal), factores de manejo (personal, instalaciones, cantidad de animales, stress), factores climáticos y otros factores (Butler, 2008). En este último grupo se incluye la calidad seminal, factor que no es analizado exhaustivamente en las IAFT y que podría transformarse entonces en causante de fracaso del programa.

Ningún examen de semen in vitro presenta una correlación alta con la fertilidad, por lo cual debe desarrollarse un protocolo de control de calidad que estudie el mayor número posible de características de los espermatozoides (Catena y Cabodevila, 1999), a fin de revelar defectos compensables y no compensables. Las técnicas de rutina empleadas en la actualidad han mejorado con la incorporación de programas de Asistencia Computarizada de Análisis de Semen (CASA por su sigla en inglés). No obstante, estas determinaciones no evalúan la presencia de muchos defectos espermáticos no compensables, que pueden detectarse con el análisis del núcleo espermático. Las pruebas nucleares permiten detectar muestras portadoras de defectos asociados con subfertilidad y pérdidas embrionarias tempranas. Algunos trabajos han demostrado que existe asociación entre fertilidad y elevados porcentajes de núcleos reactivos a las diferentes pruebas (Vieytes y col., 2008; Madrid-Bury y col., 2005; Ostermeier y col., 2001; Evenson, 1999). Muchas de las técnicas nucleares requieren equipos sofisticados y son costosas, limitando su aplicación.

Esta situación ha llevado a desarrollar alternativas, rápidas, repetibles y económicas, para que se incorporen a la rutina de control de calidad espermático en los centros de IA de nuestro país.

La IATF requiere *a priori* una mejor calidad seminal (Bó y col., 2007), ya que el semen utilizado se enfrenta a mayores exigencias, dado que las hembras son sincronizadas a través de tratamientos hormonales y las inseminaciones se realizan en un corto periodo. La selección de las mejores muestras permitiría evitar la necesidad de repetir las inseminaciones o el repaso con monta natural.

El objetivo del presente trabajo es encontrar indicadores seminales a través de análisis de rutina y del núcleo espermático, que estén asociados con tasas de preñez elevadas en muestras utilizadas para IATF, con el propósito de predecir el comportamiento de las dosis a campo.

2. Materiales y Métodos

Se procesaron eyaculados de toros con excelente estado corporal, fertilidad probada y que se encuentran en rutina de extracción por vagina artificial. Los fluidos pertenecen a diferentes razas (Bradford, Brangus colorado, Brangus, Aberdeen Angus colorado y negro, etc). Las dosis fueron congeladas según el protocolo estandarizado en el CIAVT.

Se tomarán en forma aleatoria muestras de cada partida de semen bovino congelado que serán empleadas en un protocolo de IATF. Las mismas se analizarán en conjunto con el CIAVT. Se realizará sobre ellas el control de calidad espermático de rutina y el control nuclear. Dentro de las pruebas de rutina se evaluarán:

- Parámetros de motilidad espermática obtenidos por análisis computarizado (CASA): Total de espermatozoides móviles, total de espermatozoides con movilidad progresiva, con movilidad local, hipermóviles y no móviles, velocidades de movimiento espermático, concentración espermática/pajuela, porcentaje de espermatozoides móviles/dosis.
- Morfología espermática: se realizará a través de la coloración de Rosa de Bengala al 3% (m/v), con microscopía de campo claro, contando un mínimo de 300 células (X1000).
- Viabilidad espermática por medio de fluorocromos: se empleará la técnica de coloración vital con CFDA / PI (6' - carboxifluoresceína diacetato / ioduro de

propidio), se utilizará microscopía de epifluorescencia, haciendo un recuento mínimo de 300 células (X1000).

- Funcionalidad de la membrana espermática: Se utilizará el test de endósmosis (HOST). Se evaluarán 300 espermatozoides por microscopía de contraste de fase (X400).
- Integridad de la membrana acrosómica: Se evaluará empleando microscopía de contraste de fase sobre un mínimo de 300 células (X1000).

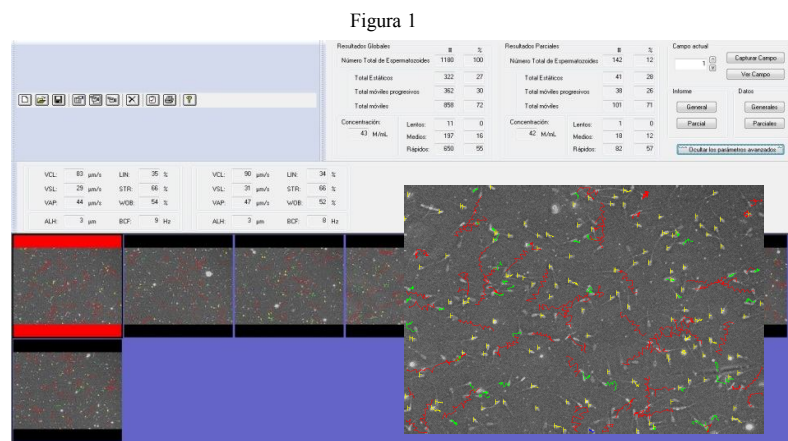


Figura 1: Captura de pantalla de un software que analiza las variables de movilidad espermáticas. La imagen ampliada muestra los trayectos espermáticos, en distintos colores, según la velocidad de los espermatozoides.

También se implementará un protocolo de evaluación del núcleo espermático que incluirá:

- Morfología: se utilizará la reacción de Feulgen. Se evaluará un mínimo de 300 núcleos espermáticos empleando microscopía de campo claro (X1000).
- Maduración de la cromatina: se empleará la técnica de coloración con Azul de Anilina. Se evaluará un mínimo de 300 núcleos empleando microscopía de contraste de fase combinada con microscopía de campo claro (X1000).
- Decondensación nuclear: se implementará la prueba de control de calidad de condensación de la cromatina espermática en presencia de agentes reductores (NCD). Se revelarán los resultados, al emplear la coloración metacromática de Azul de Toluidina. En cada extendido se evaluarán 300 núcleos empleando microscopía de campo claro (X1000).

- Fragmentación nuclear: se realizará a través de una prueba de menor costo, alternativa a las descritas en la bibliografía, desarrollada en nuestro laboratorio. Ésta permite obtener patrones morfológicos nucleares claramente diferenciables entre los núcleos fragmentados y no fragmentados, tras la exposición a diferentes tratamientos de hidrólisis y lisis.

Figura 2

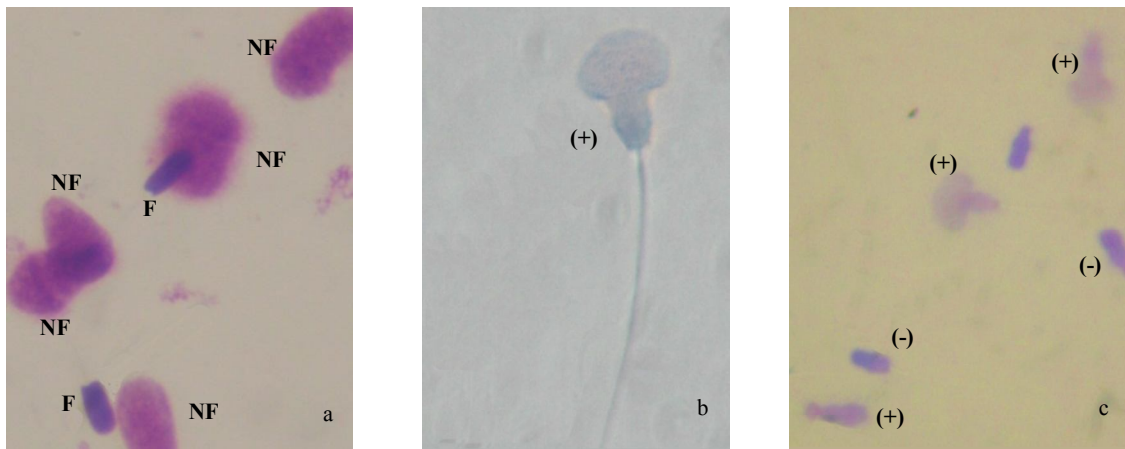


Figura 2: a: Prueba de fragmentación del ADN. Se observan núcleos no fragmentados (NF) con importantes signos de decondensación y núcleos fragmentados (F) con escasos a nulos signos de decondensación. b y c: Prueba de decondensación de la cromatina espermática NCD. (-): núcleos de tamaño normal y coloración homogénea, (+): núcleos decondensados, con vacuolas e importante pérdida de la forma.

a: microscopía de campo claro (X1000, magnificación digital: 11X); b: microscopía de contraste de fase (X1000, magnificación digital 11X) y c: microscopía de campo claro (X1000, magnificación digital: 3X).

En forma paralela, los responsables del CIAVT seleccionarán los establecimientos donde se realizarán los protocolos de IATF así como los profesionales responsables de implementarlos. Estos completarán planillas conteniendo la siguiente información: Fecha de los trabajos, establecimiento, ubicación, temperatura ambiente durante la IATF, profesional responsable interviniente, categoría de vientres, cantidad, raza, método de selección, estado corporal, protocolo de IATF y diagnóstico de preñez.

3. Resultados esperados

Sobre la base de los resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo (Laboratorio de Calidad Seminal y Criopreservación de Gametas de la Cátedra de Física Biológica, INITRA, FCV, UBA), así como los reportados en la bibliografía, y la experiencia de

campo de los responsables del CIAVT, se espera encontrar asociación entre algunos de los parámetros seminales analizados y los porcentajes de preñez obtenidos por la técnica de IATF.

4. Conclusiones

La mayoría de las modificaciones que buscan mejorar los resultados de campo de la técnica de IATF involucran aspectos de la calidad sanitaria y reproductiva de las hembras, así como aquellos relacionados con el manejo. Se plantea un enfoque complementario a los mencionados, ya que este proyecto intenta encontrar la existencia de indicadores de clasificación de fertilidad y de pérdidas embrionarias tempranas, lo que permitiría realizar una selección de los individuos más aptos para ser empleados como donantes para IATF.

La obtención de estos indicadores permitiría la categorización de toros cuya calidad seminal se vería reflejada en mejores resultados de campo al utilizar la técnica de IATF. De esta forma se podrían comercializar muestras de semen especialmente seleccionadas, con el valor agregado que esto conlleva.

Bibliografía

Bo, G.A.; Cutaia, L.; Chesta, P.; Balla, E.; Picinato, D.; Peres, L.; Maraña, D.; Baruselli. (2007). "P.S Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, ¿Cómo tener los mejores resultados?" *Brangus*, 29(55), pp.84-90.

Butler, H. M. (2008). "Comunicación Oral. Claves para una IAFT exitosa en rodeos de cría. Charla para panel de las IV Jornadas Taurus de Reproducción Bovina, USAL Pilar, Buenos Aires (11 de septiembre del 2008)". Disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/136-butler.pdf

Catena, M. y Cabodevila, J. (1999). "Evaluación de semen bovino congelado". *Taurus*, 1(3), pp.18-31.

Evenson, D. (1999). "Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects". *J. Reprod. Fertil. Dev.* 11, pp. 1-15

Fioretti, C. C. (2006). "Inseminación Artificial: Una poderosa herramienta subutilizada". *Angus*. 234, pp. 50-55.

Madrid-Bury, N., Pérez-Gutiérrez, J.F.; Pérez-Garnelo, S.; Moreira, P.; Pintado Sanjuanbenito, B.; Gutiérrez-Adán, A.; de la Fuente Martínez, J. (2005). "Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa" *Theriogenology*, 64(2), pp.232-241.

Ostermeier, G.; Sargeant, G.; Yandell, B.; Everson, D.; Parrish, J. (2001). "Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape". *J. Androl.* 72 (4), pp. 595-603.

Vieytes A.; Cisale, H.; Ferrari, M. (2008). "Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility". *Veterinary Record*. 163, pp. 625-629.