

¿PUEDE EL ANÁLISIS SEMINAL PER SE PREDECIR REALMENTE LA FERTILIDAD POTENCIAL EN TOROS?

Can Routine Semen Analysis by Itself Really Predict Potential Fertility of Bulls?

Lourdes Tibisay Vilanova Fernández¹ y Renato Gatica García²

¹Decanato de Ciencias Veterinarias, UCLA. Barquisimeto, Venezuela. ²Universidad Austral de Chile, Instituto de Reproducción Animal. Oficina de Correos II, Valdivia, Chile.

RESUMEN

En la presente investigación se evaluaron las características seminales de 8 toros Holstein entre 2 y 4 años de edad pertenecientes a un centro de inseminación artificial (CIA-UACH) mediante pruebas de rutina para estimar su fertilidad potencial mediante el índice de fecundación *in vitro* de ovocitos homólogos. De cada uno de los toros fueron evaluados 12 eyaculados. El índice de fecundación *in vitro* se determinó en 3 eyaculados, escogidos al azar, de cada uno de los 8 toros utilizando ovocitos madurados *in vitro* obtenidos de ovarios de vacas sacrificadas. Además se evaluó el volumen del eyaculado, concentración y motilidad espermática en semen fresco y post descongelación e integridad de acrosoma. Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva y una matriz de correlaciones para obtener el grado de asociatividad entre las variables. La motilidad progresiva post-congelación resultó ser la variable con mayor influencia en la determinación de los eyaculados destinados a la comercialización, mostrando mayor asociatividad con la fecundación *in vitro*. Sin embargo, no se comprobó una relación entre la fertilidad potencial y una variable seminal única, sugiriendo que la fertilidad debe ser estimada por una combinación de variables.

Palabras clave: Toros, semen, fecundación *in vitro*.

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the semen variables of eight (8) 2-4 year old Holstein bulls from an artificial insemination center through routine tests. The potential fertility of tested bulls was estimated through *in vitro* fertilization (IVF) rate of homologous oocytes. bulls, using 12 ejaculates from each. The IVF rate was evaluated in 3 ejaculates randomly

chosen from each bull, using matured oocytes obtained from ovaries of slaughtered cows. Sperm concentration, fresh and frozen (after thawing), sperm motility, and acrosome integrity were also evaluated. Data obtained was analyzed by descriptive statistics, and a correlation matrix was designed to obtain the association among the variables studied. Routine tests for semen evaluation showed that post-thawing progressive motility is the sperm treatment with the greatest influence on the selection of commercial ejaculates, and also the one showing the greatest association with IVF. However, no relation was confirmed between potential fertility and any one of the semen variables, which suggests that a combination of variables must be used in bull fertility estimates.

Key words: Fertility, sperm, *in vitro* fertilization.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la evaluación de la calidad y capacidad fecundante del semen bovino ha incrementado su importancia en la industria de la inseminación artificial y en los programas de selección de reproductores y mejoramiento genético, no sólo porque involucra directamente la fertilidad de los toros, sino también por el alcance que puede tener esta búsqueda en la fertilidad de su descendencia. Aunque se han propuesto diferentes métodos de evaluación seminal como indicadores de la fertilidad de los toros, la aplicación de una única prueba de evaluación seminal no siempre es suficiente. Por ello, existe una búsqueda continua de alguna prueba seminal o combinación de varias que permita predecir la fertilidad con la mayor exactitud, rapidez y bajos costos.

Son múltiples las características que determinan la calidad del semen; en definitiva, todas aquellas implicadas en el proceso final de la fecundación, entre ellas están la motilidad progresiva y la morfología espermática que han sido tradicionalmente empleadas en la evaluación de la calidad seminal de

diversas especies. Algunos autores afirman que la determinación de estas características es valiosa en la eliminación de eyaculados de pobre capacidad fecundante, pero representan un limitado valor predictivo de la fertilidad real de los reproductores [18, 26, 27].

Existe controversia entre los resultados obtenidos en investigaciones que intentan relacionar la motilidad espermática con la fertilidad de los toros. Autores han reportado la relación de esta variable con la fertilidad bovina *in vivo* [22] e *in vitro* 1. No obstante, la estimación subjetiva de la motilidad espermática post-congelación se relaciona escasamente con la fertilidad, a pesar de que se trata de una variable ampliamente utilizada en los centros de inseminación [24]. Por otra parte, existe una correlación positiva significativa entre la motilidad y velocidad espermática post-congelación con la tasa de no retorno 10 y además, la determinación de la concentración y morfología espermáticas posee valor diagnóstico, pues se ha comprobado que la presencia de espermatozoides anormales en el eyaculado tiene una relación directa con la fertilidad bovina [26].

Algunos trabajos realizados en los últimos años han determinado el efecto que ejerce el toro sobre la tasa de división celular después de la fecundación *in vitro*, y han relacionado dichos resultados con la tasa de no retorno [8, 12, 14, 25]. Los resultados de FIV podrían representar una buena alternativa en la predicción de la fertilidad potencial de los toros [13, 27], ya que la variabilidad encontrada entre los toros en los índices de división celular post-FIV, sugiere que su cuantificación pudiera reflejar la fertilidad potencial de los mismos [13, 17].

El presente estudio pretende comparar pruebas seminales tradicionalmente empleadas en un centro de inseminación artificial con la fertilidad de los toros expresada en el índice de FIV de ovocitos bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron evaluados 8 toros Holstein, de 2 a 4 años de edad, estudiando una totalidad de 95 eyaculados. El semen fue recolectado mediante vagina artificial dos veces por semana, y fue diluido con TRIS (20% yema de huevo y 6,4% de glicerol) y envasado en pajuelas Minitub^R (0,25 mL).

Después de la recolección de semen, se procedió a la medición directa del volumen (VOL) con tubos cónicos calibrados, y la concentración espermática (CONC) con un contador automático de células (modelo PC-602^a). Luego fue evaluada la calidad del movimiento espermático mediante microscopía de contraste de fases. Esta evaluación fue realizada tanto en semen fresco (MOTF) como en semen congelado (MOTC).

Posteriormente fue estudiada la morfología espermática (ME) mediante un frotis fino de semen fresco teñido con la coloración Spermac^R bajo microscopía óptica y objetivo de inmersión donde fueron contadas 200 células por muestra.

La integridad acrosómica post-congelación fue determinada en semen diluido en la solución de Hancock modificada. Se observó bajo cubreobjeto la presencia o ausencia del acrosoma (ACR) con microscopía óptica de contraste de fases y objetivo de inmersión, en 100 células por muestra.

La FIV se realizó con ovocitos provenientes de ovarios de vacas sacrificadas en el matadero local a 20 Km del laboratorio. Los ovarios fueron transportados en solución fisiológica con antibióticos a 25-30°C y antes de dos horas fueron lavados con solución fisiológica estéril a 35°C. La recuperación de los complejos cúmulo-ovocito (CCO), fue realizada mediante aspiración de los folículos de 2 a 5 mm de diámetro con agujas 18 g x 1,5 pulgadas. El líquido folicular aspirado fue colocado en tubos cónicos mantenidos en baño de agua a 35°C. Posteriormente, el sedimento de cada tubo se colocó en placas Petri estériles conteniendo Dulbecco-PBS y los CCO observados bajo microscopio estereoscópico fueron clasificados y se escogieron aquellos que presentaron al menos 8 capas compactas de células del cúmulo y citoplasma homogéneo. Los CCO seleccionados fueron lavados 2 veces en medio Dulbecco-PBS a 35°C y luego colocados en microgotas de 50 µl (20-25 por microgota) del medio de maduración TCM-199 (Sigma), cubiertos con parafina líquida y colocados en una estufa de cultivo por 22 a 24 horas en aire con 5% de CO₂ a 39°C y 90% de humedad. Una vez concluida la fase de maduración fueron seleccionados para ser usados en FIV aquellos ovocitos con expansión de las células del cúmulo, indicativa de la metafase II para ser fecundados por los espermatozoides.

Se procedió a descongelar dos pajuelas de semen en agua a 40°C por 15 segundos, el semen obtenido se lavó 2 veces por centrifugación a 500 g por 5 minutos con 6 mL de la solución BO con heparina 2. Posteriormente se determinó la concentración espermática con una cámara de Neubauer, procediéndose a ajustar la concentración 25×10^6 células/mL con la solución BO con heparina, agregándose igual cantidad de medio de dilución espermática BO-BSA para llevar la concentración espermática hasta $12,5 \times 10^6$ células/mL. Se prepararon microgotas de 100 µl de esta solución con espermatozoides para ser utilizadas en la fecundación *in vitro* de los ovocitos los que previamente fueron introducidos en el medio de lavado de ovocitos BO - BSA.

Los gametos permanecieron en las gotas de fecundación por 6 horas a 39°C, 5% de CO₂ y máxima humedad. Los CCO se transfirieron a microgotas conteniendo el medio de cultivo TCM-199 (Sigma) e incubaron por 48 horas. Finalizada la incubación, los CCO fueron lavados en PBS por agitación y se determinó la presencia de división celular bajo la lupa estereoscópica, la cual fue expresada en porcentaje de ovocitos divididos.

La FIV fue realizada en 3 eyaculados de cada uno de los 8 toros escogidos al azar según fórmula estadística [15]. La evaluación de la FIV se realizó a través de la tasa de división celular a las 48 horas, para lo cual fueron empleados entre 150 y 200 ovocitos por cada uno de los toros en estudio.

RESULTADOS

En la TABLA I se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de evaluación de semen para los 95 eyaculados estudiados, de los cuales hubo 64 (67,4%) eyaculados congelados y comercializados y 31 (32,6%) descartados. De los 31 eyaculados descartados, 19 (61,3%) fueron eliminados pre-congelación por no cumplir con los valores mínimos de volumen, concentración espermática o motilidad progresiva, y los 12 restantes (38,7%) por baja motilidad progresiva post-congelación.

La tasa de fecundación de ovocitos en los 95 eyaculados fue 32,9% siendo en los 64 eyaculados congelados y comercializados de 47,1% (TABLA II); en los eyaculados descartados pre-congelación fue de 12,9% y en los 12 descartados post-congelación alcanzó un 16,3%. Se observó diferencias significativas entre el porcentaje de división celular de los eyaculados congelados y los descartados pre-congelación ($P = 0,001$), y entre los eyaculados congelados y los descartados post-congelación ($P = 0,008$).

El grado de asociación entre las pruebas rutinarias y la FIV se evidenció en una matriz de correlaciones (FIG. 1) en la cual se muestran varias correlaciones positivas significativas. Entre las variables más correlacionadas del conjunto se identificaron la MOTC y la ACR. Los resultados de división celular en la FIV no guardan relación significativa con ninguna de las variables restantes, encontrándose una correlación media entre la FIV y la MOTC de 0,40.

DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en la evaluación de semen mediante pruebas rutinarias indican la existencia de diferencias significativas entre los eyaculados con características mínimas para ser congelados y comercializados y los eyaculados descartados pre-congelación para todas las variables estudia-

das, a excepción de la concentración espermática (CONC). Por otro lado, al comparar los eyaculados congelados y comercializados con los descartados post-congelación se encontraron diferencias significativas solamente en la motilidad espermática post-congelación (MOTC) (TABLA I).

El volumen de los eyaculados congelados y comercializados (4,9 mL) resultó ligeramente inferior al de los eyaculados descartados pre-congelación (6,7 mL) y al de los descartados post-congelación (5,7 mL). No obstante, el volumen seminal obtenido en los tres grupos se encuentra dentro del rango normal reportado para toros *Bos taurus* con edades comprendidas entre 2 y 4 años de edad [7]. Tomando en cuenta que el volumen del eyaculado de un toro es de carácter variable, con diferencias entre el mismo individuo y de un individuo a otro debido a la constitución genética, raza, edad, estación de año, método y frecuencia de recolección, calidad de la alimentación y el tiempo de excitación sexual antes de la eyaculación [11] y que además, no tiene relación con la fertilidad potencial de los toros [24], la diferencia observada entre el volumen seminal de los tres grupos de eyaculados carece de importancia en este sentido.

La concentración espermática, al igual que el volumen seminal, es de gran variabilidad entre los toros y depende principalmente de la edad del animal, la circunferencia escrotal, ritmo de recolección, estación del año y duración de la preparación sexual. En este estudio, la concentración resultó ser superior en los eyaculados congelados que en los descartados tanto pre-congelación como post-congelación, estando los primeros ($900.000 \times \text{mm}^3$) dentro de los valores normales [6, 9]. Sin embargo, por ser la concentración espermática una variable seminal que escasamente se relaciona con la fertilidad potencial de los toros [24] y, que además, es de gran variabilidad, la diferencia encontrada entre los grupos de eyaculados no es relevante.

La motilidad progresiva en semen fresco encontrada en el grupo de los eyaculados congelados y comercializados fue de 69,6%, estando en el límite inferior recomendado para los toros destinados a la inseminación artificial [5, 7].

TABLA I
RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS 6 VARIABLES ESTUDIADAS DENTRO DE LAS PRUEBAS RUTINARIAS DE EVALUACIÓN SEMINAL

	1. Todos los Eyaculados (n = 95)	2. Eyaculados Congelados (n = 64)	3. ED Pre-Congelación (n = 19)	4. ED post-congelación (n = 12)	Valor de P entre 2 y 3	Valor de P Entre 2 y 4
VOL	5,4 mL \pm 1,9	4,9 mL \pm 1,8	6,7 mL \pm 1,6	5,7 mL \pm 2,2	p = 0,012	p = 0,601
CONC	850.000mm ³ \pm 350.000	900.000mm ³ \pm 330.000	700.000mm ³ \pm 400.000	850.000mm ³ \pm 310.000	p = 0,474	p = 0,441
MOTF	68,3% \pm 3,5	69,6% \pm 1,7	62,3% \pm 2,5	70,8% \pm 1,9	p < 0,05	p = 0,166
MOTC	46,4% \pm 11,3	53,2% \pm 2,8	29,4% \pm 8,3	37,0% \pm 9,6	p < 0,05	p < 0,05
ACR	78,0% \pm 8,5	80,9% \pm 6,7	71,1% \pm 8,5	73,5% \pm 9,2	p = 0,001	p = 0,262
ME	22,4% \pm 7,7	20,4% \pm 6,0	29,8% \pm 7,8	21,3% \pm 8,8	p = 0,002	p = 0,276

ED: eyaculados descartados; VOL: volumen seminal; CONC: concentración espermática; MOTF: motilidad progresiva en semen fresco; MOTC: motilidad progresiva en semen descongelado; ACR: presencia de acrosoma; ME: morfología espermática.

TABLA II
RESULTADOS DE FIV OBTENIDA EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE EYACULADOS ESTUDIADOS

Toro	N° Ovarios	N° ovocitos Aspirados	N° ovocitos Incubados		Divididos post-FIV		% División
			EC	ED	EC	ED	
1	105	421	218	–	90 / 183 49,2%	–	90 / 183 (49,2%)
2	96	620	194	–	106/165 64,2%	–	106 / 165 (64,2%)
3	156	1424	195	129	55 / 139 39,6%	20 / 110 18,2%	75 / 249 (30,1%)
4	134	1006	126	139	28 / 69 40,6%	23 / 128 18,0%	51 / 197 (25,9%)
5	142	1020	135	135	48 / 87 55,2%	20 / 120 16,7%	68 / 207 (32,9%)
6	163	1023	168	125	38 / 101 37,6%	6 / 65 9,23%	44 / 166 (26,5%)
7	166	1468	220	143	47 / 131 35,9%	14 / 62 22,6%	61 / 193 (31,6%)
8	97	860	–	203	–	16 / 193 8,3%	16 / 193 (8,3%)
Total	1059	7842	1256	874	412/875 47,1% ^a	99 / 678 14,5% ^b	511 / 1553 32,9%

EC: eyaculados congelados y comercializados; ED: eyaculados descartados pre y post-congelación.

*letras diferentes (a y b): P < 0,05.

	VOL	CONC	MOTF	MOTC	ACR	ME	FIV
VOL	1.00						
CONC	-.31	1.00					
MOTF	-.42	.34	1.00				
MOTC	-.32	.21	.59	1.00			
ACR	-.16	.16	.34	.57	1.00		
ME	.03	-.07	-.33	-.41	-.19	1.00	
FIV	-.21	.13	.30	.40	.11	-.24	1.00
VOL	CONC	MOTF	MOTC	ACR	ME	FIV	

FIGURA 1. MATRIZ DE CORRELACIONES ENTRE LAS 7 VARIABLES PARA LAS 95 UNIDADES MUESTRALES.

La media de motilidad progresiva en semen fresco en los eyaculados descartados pre-congelación fue del 62,3%, siendo en los eyaculados descartados post-congelación del 70,8%. Se observó diferencias significativas (P < 0,05) entre la MOTF de los eyaculados congelados y comercializados y los descartados pre-congelación. Sin embargo, no se encontró diferencias estadísticas entre los eyaculados congelados y comercializados y los eyaculados descartados post-congelación (TABLA I), resultado que es lógico si se toma en cuenta que al inicio del proceso de congelación los eyaculados pertenecientes a este último grupo poseían una motilidad progresiva de 70,8% que posteriormente fue afectada por el proceso de congelación. Al realizar un estudio comparativo de la MOTF y la MOTC en los tres grupos de eyaculados se demuestra que los

eyaculados comercializados presentan una leve disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles post-congelación pues sólo disminuye en 16,4 puntos porcentuales; mientras que en los eyaculados descartados pre-congelación la disminución es de 32,9 puntos porcentuales y en los descartados post-congelación es del 33,8.

Se hallaron diferencias entre la MOTC de los eyaculados congelados y comercializados y los descartados pre-congelación (TABLA I), resultado que confirma la buena selección que se realiza en este centro de inseminación sobre esta importante variable seminal, pues se pone en evidencia que los eyaculados descartados previamente a la congelación son afectados por el proceso de crioconservación. Además, al comparar la MOTF y la MOTC encontrada en los eyaculados descartados

pre-congelación se confirma lo anteriormente expuesto, ya que existe una marcada disminución de la MOTC obtenido en este grupo de eyaculados (62,3% a 29,4%).

También se obtuvieron diferencias significativas entre la MOTC de los eyaculados congelados y comercializados, y los eyaculados descartados post-congelación ($P < 0,05$). Tomando en cuenta que la MOTC fue la única variable con diferencias entre los dos grupos de eyaculados antes mencionados, es válido afirmar que la capacidad que tienen los eyaculados de mantener su movimiento progresivo después de la congelación representa la diferencia entre los eyaculados que van a ser comercializados de aquellos que son eliminados después del proceso de congelación. La evaluación de la motilidad progresiva post-congelación es la variable más ampliamente utilizada en la evaluación seminal [24], y debería evaluarse estrictamente [19] porque determina el grado de viabilidad espermática del semen congelado o el daño causado por los procesos de congelación y descongelación, y además porque es un fuerte soporte en la predicción de la fertilidad potencial de la muestra seminal.

Al determinar la presencia de acrosomas intactos inmediatamente post-congelación (ACR), se encontró diferencias ($P = 0,001$) entre los eyaculados congelados (80,9%) y los descartados pre-congelación (71,1%) indicando nuevamente una buena selección de los eyaculados que van a ser sometidos a la congelación. No se encontró diferencias entre ACR de los eyaculados congelados y los descartados post-congelación.

La determinación del acrosoma en la célula espermática después del proceso de congelación es un buen complemento para estimar la viabilidad y fertilidad potencial del semen descongelado [3] ya que se relaciona directamente con la fertilidad real de los toros [20, 21]. Igualmente ha sido reportada la relación entre el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica lograda *in vitro* y la fertilidad de los toros [27, 28]. Por lo tanto, la determinación de la presencia de acrosoma en semen descongelado puede ser un indicador de calidad seminal óptima.

En este estudio se encontró que el porcentaje de defectos espermáticos en los eyaculados congelados y comercializados fue 20,4%, en los descartados pre-congelación 29,8% y en los descartados post-congelación 21,3%. Se observó diferencias significativas entre los eyaculados congelados y comercializados y los descartados pre-congelación ($P = 0,002$), pero no entre los eyaculados congelados y comercializados y los descartados post-congelación ($P = 0,276$).

El porcentaje de defectos morfológicos en los eyaculados congelados y comercializados se determinó en el límite máximo de lo recomendado para toros de inseminación artificial, el que no debe sobrepasar el 20% [7]. De los toros con mayor porcentaje de defectos morfológicos, 3 de ellos obtuvieron los índices más bajos de división celular post-FIV, indicando una relación inversa entre los defectos morfológicos espermáticos y la capacidad de fecundar ovocitos homólogos.

En el presente trabajo se consideró el índice de división celular post-FIV como un índice de la fertilidad potencial del semen bovino y se determinó que el porcentaje de división celular después de la FIV varió considerablemente según el toro empleado, con índices promedio que oscilaron entre el 64,2% (toro 2) y el 8,3% (toro 8) (TABLA II).

Existen diferencias significativas entre el porcentaje de división celular de los eyaculados congelados y los descartados pre-congelación ($P = 0,001$), y entre los eyaculados congelados y los descartados post-congelación ($P = 0,008$). Estos resultados soportarían la premisa que el índice de división celular obtenido post-FIV refleja la calidad del eyaculado y, por lo tanto, su capacidad fecundante. La variación encontrada entre los toros en el índice de división post-FIV entre los eyaculados congelados y comercializados (70% máximo y 23% mínimo) concuerda con lo encontrado por otro estudio en el cual se reportó una variación que osciló entre el 36 y 95% de ovocitos fecundados. Quizás el rango máximo de división post-FIV (70%) en este estudio se ubicó por debajo de lo reportado por estos investigadores [23] por el hecho de no haber empleado en este trabajo ningún método de separación espermática.

La variación en la capacidad fecundante *in vitro* de ovocitos homólogos encontrada entre los toros, pudiera ser el resultado de diferencias en las características metabólicas de los espermatozoides, en la edad de los reproductores, en el contenido de plasma seminal y en la relación entre el volumen de plasma seminal y el número de células espermáticas [23].

El toro con menor tasa de división (8,3% en el toro 8) presentó el mayor porcentaje de defectos morfológicos (33,4%), cifra que está muy por encima de lo recomendado para los reproductores empleados en inseminación artificial. De igual manera, se determinó una correlación negativa (-0,24) entre el porcentaje de anomalías y la tasa de división post-FIV (FIG. 1), resultados que concuerdan con otro estudio [16] en el que se encontró una correlación negativa significativa (-0,85) entre las mismas variables y una menor tasa de división post-FIV en el toro con mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales.

Por otro lado la variable que más se interrelaciona con las demás es la motilidad progresiva post-congelación (MOTC) y, además, es la variable con mayor asociatividad con la FIV ($r = 0,40$), siendo una correlación de nivel medio. Tomando en cuenta que la cuantificación del índice de FIV ha sido empleada en la determinación de la fertilidad potencial de los toros usados en inseminación artificial [13, 17], esta correlación encontrada se puede extrapolar a lo reportado por otros investigadores [4], quienes encontraron una correlación media del 0,53 entre la motilidad progresiva post-congelación y el índice de no retorno.

De estos resultados se puede deducir que la mejor evaluación del semen congelado debe basarse en la medición de variables que evalúen la actividad metabólica espermática. Una de las variables que refleja dicha actividad, y la más ampliamente utilizada en la evaluación seminal es la motilidad progresiva

post-congelación [24] cuya evaluación en este trabajo, como fue mencionado, mostró su mayor correlación con la FIV.

Las asociaciones significativas encontradas (TABLA II) con la motilidad progresiva post-congelación (MOTC) se establecen, en la mayoría de los casos, con las variables que reflejan la actividad metabólica espermática. Si bien es cierto que la viabilidad espermática se considera un fenómeno bastante complejo [3], se puede decir que depende básicamente de la integridad de la membrana plasmática, pues en esto radica la facultad de la célula para realizar sus actividades metabólicas, además de ser imprescindible para lograr los cambios plasmáticos requeridos en los procesos de capacitación y reacción acrosómica, y en la unión del espermatozoide a la superficie del ovocito. De lo anterior se deduce que es lógica la existencia de correlaciones entre las variables seminales que involucran directamente la integridad de la membrana plasmática, relacionando la actividad metabólica del espermatozoide (evidenciada por su movimiento y su capacidad de resistencia) y la integridad del acrosoma, como lo demuestra la correlación encontrada entre la MOTC y ACR (0,57). Como se indicó anteriormente, el porcentaje de defectos morfológicos de los espermatozoides tiene una correlación negativa con la FIV ($r = -0,24$), que si bien es de nivel poco significativo, evidencia que la presencia de espermatozoides anormales en el eyaculado tiene una relación directa con la fertilidad bovina, concordando con lo reportado por otros investigadores [26] quienes determinaron, que el porcentaje de espermatozoides con cabezas anormales, vesiculaciones nucleares y gotas citoplasmáticas proximales se correlacionan negativa y significativamente con la tasa de no retorno.

CONCLUSIONES

Se encontró que la motilidad progresiva post-congelación es la variable de mayor asociatividad con la fecundación *in vitro* ($r = 0,40$) y es la que más se interrelaciona con las demás. Por lo tanto, puede sugerirse que esta variable pudiera ser de un alto valor predictivo de la fertilidad potencial del eyaculado y su determinación debería hacerse de manera estricta y rutinaria. Todos los resultados de asociatividad encontrados entre las variables estudiadas indican que no existe una relación entre la fertilidad potencial y una variable seminal única, sino que la fertilidad debe ser estimada por la combinación de todas ellas y, por lo tanto, se deben realizar múltiples análisis de regresión que combinen los resultados de varias características seminales.

AGRADECIMIENTO

Al Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile, en especial al Sr. Carlos Jara por su asistencia técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAVISTER, B.D. A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamster eggs. **Gam. Res.** 23: 139-158. 1989.
- [2] BRACKETT, B.; OLIPHANT, G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. **Biol. Reprod.** 12: 260-274. 1975.
- [3] CAPDEVIELLE, E. Semen congelado: calidad y evaluación. **Therios**, suplemento especial (Capítulo 4). 1997.
- [4] CORREA, J.; PACE, M.; ZAVOS, P. Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology** 48: 721-731. 1997.
- [5] CHENOWETH, P. Selección y manejo de toros. **XXV Jornadas Uruguayas de Buiatria**. Paysandú-Uruguay. 1997.
- [6] GARNER, D.; HAFEZ, E. Espermatozoides y plasma seminal. 1996. En: Hafez, E.S.E. **Reproducción e inseminación artificial en animales**. Ed. Interamericana, McGraw-Hill, México. 1996.
- [7] HELLEMANN, C. **Andrología e inseminación artificial. Guía de clases y prácticos**. Universidad Austral de Chile, Facultad de Cs. Veterinarias. 1996.
- [8] HILLERY, F.; PARRISH, J.; FIRST, N. Bull specific effects on fertilization and embryonic development in vitro. **Theriogenology** 33 (abst.): 249. 1990.
- [9] HUNTER, R. **Reproducción de los animales de granja**. Ed. Acribia, S.A. España, 200 pp. 1987.
- [10] KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Vet. Scan.** 34: 299-303. 1993.
- [11] KOMMISRUDE, E.; ANDERSEN, K. The influence of duration of sexual preparation on bovine semen characteristics and fertility rates. **Reprod. Dom. Anim.** 31: 369-371. 1996.
- [12] MARQUANT Le GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization test. **Reprod. Nutr. Dev.** 30: 259-266. 1990.
- [13] MARQUANT Le GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Test de fertilité chez l'animal domestique par fécondation in vitro. **Ann. Zoot.** 41: 361-370. 1992.
- [14] MARQUANT Le GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; GUILLOIN, N.; GERARD, O.; THIBIER, M. 1992. In vitro fertilization as a tool to evaluate fertility in the bovine. Citado por: LONERGAN, P. The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility. **Reprod. Dom. Anim.** 29: 12-21. 1994.

- [15] MARTIN, W.; MEEK, A.; WILLEBERG, P. **Veterinary Epidemiology. Principles and Methods**. Iowa State University Press. Ames. Chapter 2. 1987.
- [16] MERCADO, R. Efecto de la adición de un surfactante al diluyente TRIS para crioconservación de semen bovino. **Tesis-Magister en Cs. mención Reproducción Animal. IRA-FCV-UACH**, Chile. 1996.
- [17] PINEDA, C. Estudio de la aptitud reproductiva de toros frisón negro chileno utilizados en inseminación artificial. **Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de la Frontera**, Chile. 1996.
- [18] RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; ZHANG, B.; SÖDERQUIST, L. Assessment of bull sperm fertilizing ability. **Reprod. Dom. Anim.** 31: 515-517. 1996.
- [19] RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Optimization of sperm quality in AI bulls. **Reprod. Dom. Anim.** 33: 233-237. 1998.
- [20] SAACKER, R.; WHITE, J. 1972. En: CUMMING, I. Suitability of intact acrosome method for the prediction of fertility in bovine artificial insemination. **Vet. Rec.** 136: 289-291. 1995.
- [21] SAACKER, R. Semen quality in relation to semen preservation. **J. Dairy Sci.** 66: 2635-2644. 1983.
- [22] SAACKER, R.; DeJARNETTE, J.; NEBEL, R.; NADIR, S. Assessing bull fertility. **Proc. of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology**, San Diego, CA., 56-69. 1991.
- [23] SAEKI, K.; NAGAO, Y.; HOSHI, M.; NAGAL, M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. **Theriogenology** 43: 751-759. 1995.
- [24] SALISBURY, G.; VanDEMARK, N.; LODGE, J. **Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle**. Ed W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp 428-441. 1978.
- [25] SHI, D.; LU, K.; GORDON, I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. **Theriogenology** 33 (abst.): 324. 1990.
- [26] SÖDERQUIST, L.; JANSSON, L.; LARSSON, K.; EINARSSON, S. Sperm morphology and fertility in AI bulls. **J. Vet. Med. A.** 38: 534-543. 1991.
- [27] WHITFIELD, C.; PARKINSON, T. Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. **Theriogenology** 38: 11-20. 1992.
- [28] WHITFIELD, C.; PARKINSON, T. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reaction with calcium ionophore (A23187). **Theriogenology** 44: 413-422. 1995.