

CALIDAD SEMINAL DE TOROS CRIOLLO LIMONERO

Semen Quality in Criollo Limonero Bulls

Edward Crespo ^{1*} y Armando Quintero-Moreno ²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). ²Laboratorio de Andrología, Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, estado Zulia, Venezuela. *ecrespo79@gmail.com

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la calidad del semen fresco en toros Criollo Limonero (CL) se colectaron muestras seminales de 10 toros durante cuatro semanas (40 muestras) mediante vagina artificial, los cuales tenían una edad y peso corporal promedio de $41,4 \pm 1,04$ meses y $441,5 \pm 5,73$ K., respectivamente. Los datos se caracterizaron mediante estadística descriptiva y las diferencias entre los toros y entre las semanas evaluadas se analizaron mediante el procedimiento GLM del SAS. Los parámetros evaluados correspondieron a la circunferencia escrotal (CES), volumen del eyaculado (VL), concentración espermática (CE) calculada mediante cámara de Neubauer, motilidad masal (MM) e individual progresiva (MI) medida mediante observación visual, mientras que la vitalidad (VI), las anomalías espermáticas (AE) y los acrosomas reaccionados (AR) se cuantificaron luego de hacer frotis mediante la tinción de Eosina-nigrosina por observación microscópica. La CES correspondió a $34,4 \pm 0,43$ cm, el valor de VL fue de $4,43 \pm 0,25$ mL con una CE de $839,50 \times 10^6 \pm 35,32 \times 10^6$ espermios/mL. Los valores observados de MM y MI fueron de $3,2 \pm 0,08$ y $70,50 \pm 0,81\%$, respectivamente, mientras que los valores promedios de VI, AE y AR fueron de $72,77 \pm 1,46\%$, $14,07 \pm 0,77\%$ y $24,47 \pm 3,94\%$. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los toros evaluados para ninguna de las variables estudiadas, lo cual indica homogeneidad entre los animales. Todos los valores obtenidos se encuentran dentro de los parámetros de calidad seminal establecidos para la especie bovina, incluyendo otras razas bovinas criollas, por lo cual el semen de CL podría ser procesado para criopreservación y utilizado en programas de inseminación artificial.

Palabras clave: Calidad seminal, semen fresco, Criollo Limonero.

ABSTRACT

In order to determine the quality of fresh semen in Criollo Limonero bulls (CL), semen samples were collected in ten sires for four weeks (40 ejaculates) using an artificial vagina, those bulls had a mean age of 41.4 ± 1.04 months and body weight of 441.5 ± 5.73 kg, respectively. Data were characterized using descriptive statistics and differences among bulls and weeks were analyzed using the GLM procedure of SAS. Parameters evaluated corresponded to scrotal circumference (CES), ejaculate volume (VL), sperm concentration (CE) calculated by Neubauer chamber, mass motility (MM) and individual progressive motility (MI) measured by visual observation, whereas sperm vitality (VI), sperm abnormalities (AE) and acrosome reacted (AR) were evaluated by staining smears with Eosin-nigrosin stain and microscopic observation. The CES values were for 34.4 ± 0.43 cm, and the observed average value of VL was 4.43 ± 0.25 mL and $839.50 \times 10^6 \pm 35.32 \times 10^6$ sperm/mL for CE. Values of MM and MI were 3.2 ± 0.08 and $70.50 \pm 0.81\%$, respectively, while mean values of VI, AE and AR were $72.77 \pm 1.46\%$, $14.07 \pm 0.77\%$ and $24.47 \pm 3.94\%$. No significant differences ($P > 0.05$) among bulls were observed for the studied variables, indicating homogeneity among animals. All values obtained are within the parameters of seminal quality established for bovine species, including other native cattle breeds, so CL semen cryopreservation could be performed and used in artificial insemination programs.

Key words: Semen quality, fresh semen, Criollo Limonero.

INTRODUCCIÓN

El ganado Criollo de Venezuela se originó a partir de diversos bovinos (*Bos taurus*) provenientes de la Península Ibérica, las Islas Canarias y Portugal, los cuales llegaron a América en el año 1497 durante la conquista española y la época colonial [16]. En Venezuela, un grupo de ese tipo de ganado con características de tipo lechero se estableció en la región

occidental del país, específicamente en las riberas de los ríos Guasare, Socuy y Limón, en los municipios Mara y Páez del estado Zulia, originando lo que hoy se conoce como ganado Criollo Limonero (CL), los cuales se caracterizan por ser animales rústicos y bien adaptados al ambiente, resistentes a enfermedades y excelentes pastoreadores [7, 14, 15]. Los genes que aportan las razas criollas o autóctonas, como es el caso del CL son de gran importancia, ya que éstas han pasado por un sistema de selección natural, que les ha proporcionado una adaptación a condiciones agroecológicas adversas del trópico, mejorando notablemente los índices productivos y reproductivos cuando son utilizados en planes de cruzamientos con razas especializadas en la producción de leche [34].

En la actualidad existen menos de 700 animales CL puros que se encuentran en custodia del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), específicamente en la estación experimental Carrasquero, hacienda El Laral, ubicada en el municipio Mara del estado Zulia [23]. Debido a la poca cantidad de animales CL puros existentes y la necesidad de la implementación de programas de cruzamientos para la difusión de la raza, se hace necesario realizar evaluaciones de los toros CL en cuanto a su Calidad Seminal (CS), con la finalidad de disponer de semen criopreservado de alta calidad para ser utilizados en programas de inseminación artificial (IA).

La valoración de la CS es una de las herramientas de análisis más empleada en la clasificación de los machos para el servicio de monta natural o programas de IA, pudiéndose obtener información en cuanto al potencial reproductivo de los toros e inclusive determinar si existen alteraciones en el proceso de la espermatogénesis [4]. La evaluación de la calidad del semen fresco se realiza mediante la evaluación de características macroscópicas (volumen, color, olor, aspecto), así como características microscópicas (motilidad masal e individual, vitalidad, anomalías morfológicas) [22]. La interpretación de los resultados del análisis seminal debe hacerse tomando en cuenta diversos factores, como lo son la historia clínica de los toros, la raza, la edad y las condiciones ambientales a los cuales están expuestos [20].

Debido a la importancia que posee el ganado CL para la ganadería venezolana se planteó como objetivo de este trabajo caracterizar la calidad del semen fresco de toros CL y establecer si su calidad está acorde con los estándares referenciados para la especie bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El experimento fue desarrollado en la Estación Local Carrasquero (Hacienda El Laral: 10°58'13" LO, 72°07'22" LE) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), la cual se ubica en el sector Playa Bonita de la parroquia Luis de Vicente del municipio Mara del estado Zulia. Esta es una zona agroecológica catalogada como bosque seco tropical,

con precipitaciones anuales entre 810 y 920 mm/año, las cuales se distribuyen mayormente durante los meses de septiembre, octubre, noviembre y principio de diciembre, con una temperatura ambiental de 27,4°C (19,7-35,2°C), humedad relativa de 77,3% (67-91%) y una altura de 6,17 msnm [13].

Unidades experimentales

Las muestras de semen fueron obtenidas de 10 toros adultos de la raza CL, los cuales tenían una edad y peso corporal promedio de 42 ± 6 meses y 441,5 ± 37,8 K, respectivamente. Se evaluaron 40 muestras de semen recién colectado (4/toro). Es importante destacar que el modelo experimental incluyó esta cantidad de toros derivado del hecho de que a nivel mundial hay menos de 700 ejemplares puros registrados de la raza CL [23], la mayoría hembras, lo cual justifica la cantidad de toros utilizados. Los toros utilizados en el experimento se encontraban en excelentes condiciones corporales y llevaban un estricto control sanitario. Los mismos fueron alimentados durante el día, a pastoreo, en potreros de pasto Alemán (*Echinochloa polystachya*) y durante la noche fueron alojados en toriles individuales donde se les suministraba 2 kg. de alimento concentrado/toro (18% PC), tanto en los potreros como en los toriles los animales tenían acceso *ad libitum* al agua y a un mineral comercial (MINERALINIA®).

Circunferencia escrotal (CES)

La medida de la CES se realizó siguiendo la metodología dada por la Sociedad Americana de Teriogenología Veterinaria (SATV) para el Estudio de la Evaluación Reproductora [9]. La CES se midió con una cinta escroto-testicular (Implegan® Modelo Coulter, Colombia).

Colección de semen

La colección del semen se realizó durante cuatro semanas continuas, los días martes de cada semana entre las 6:00 y 8:00 am., utilizando vagina artificial (IMV® Modelo 005417, Francia), la cual se mantenía a una temperatura interna entre los 38 y 39°C. Antes de realizar la colecta, se procuró que cada toro realizara dos montas falsas con la finalidad de obtener una mayor estimulación. Luego de tomar la muestra, el semen fue llevado inmediatamente al laboratorio y se colocó dentro de un baño de María a 37°C (Precision Modelo 188, Illinois, EUA) y así poder realizar de manera más controlada las respectivas evaluaciones macroscópicas y microscópicas que determinan las características seminales óptimas de cada eyaculado.

Evaluaciones seminales

Volumen (VL)

El VL del eyaculado fue medido mediante observación directa del tubo colector graduado utilizado para la colección y el valor fue expresado en mL. Los tubos colectores estaban protegidos por una funda plástica, la cual contenía agua tibia

con la finalidad de evitar cambios bruscos de temperatura y que incidieran los rayos solares en la muestra.

Olor, color y aspecto

El olor fue determinado olfateando directamente la muestra de semen en el tubo colector, el color y el aspecto fueron determinados mediante observación directa de la muestra. Fueron descartadas aquellas muestras que presentaran colores amarillentos, rojizos o pardos, así como aquellas muestras que tuviesen un olor extraño, diferente al característico que indique alguna contaminación, con orina o alguna secreción derivada de una patología genito-urinaria.

Motilidad masal (MM)

Para determinar este parámetro se procedió a tomar una alícuota (10µL) de la muestra colectada y colocada en una lámina portaobjeto previamente calentada a 37°C en una platina térmica (Osaka®, modelo OK51, España). La valoración se realizó de manera subjetiva mediante la observación con un microscopio óptico (Cole Parmer® 6006, Illinois, EUA) con un aumento de 100X, valorando el movimiento de las células espermáticas en conjunto. La clasificación de este parámetro se realizó utilizando el criterio utilizado por la SATV [9].

Motilidad individual progresiva (MI)

Para evaluar la MI se procedió a tomar una alícuota (20µL) de semen y se diluyó en 1mL de solución fisiológica, la cual se encontraba en tubos de ensayos a una temperatura de 37°C. Posteriormente se tomó una gota del semen diluido y fue colocada en una lámina portaobjeto mantenida a 37°C mediante una platina térmica y se cubrió con una lámina cubreobjetos para ser evaluado. La valoración se realizó de manera subjetiva observando el movimiento individual de los espermatozoides con el fin de determinar el porcentaje de células con movimiento rectilíneo progresivo del total de espermatozoides observados en tres campos microscópicos del eyaculado. La observación fue realizada con un microscopio óptico con un aumento de 400X. Para determinar la valoración de la motilidad individual se utilizó el criterio de la SATV [9].

Concentración espermática (CE)

La concentración espermática fue calculada utilizando una cámara de recuento celular (Neubaüer) (Boeco®, Alemania); para ello se realizó una dilución del semen de 1:200. Para realizar la dilución se tomó 30 µL de semen y se diluyó en 6 mL de una solución espermicida previamente preparada (9 g. de cloruro de sodio, 3mL. de formol en 1000 mL de agua destilada). Una vez realizada la dilución se esperaron tres minutos (mm) para garantizar que los espermatozoides murieran, posteriormente se procedió a tomar una alícuota de 10µL del semen diluido y se llenó la cámara de Neubaüer para realizar el conteo celular con un microscopio óptico con un aumento 400X. Para determinar el número de espermatozoides se pro-

cedió a contar las cabezas de espermatozoides observadas en cinco de los cuadros (cuadros de las esquinas y central) pertenecientes al cuadro grande central de la cámara y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Espermios/mL} = \left(\frac{\text{Espermios contados}}{\text{superficie contada (mm}^2\text{)}} \times \text{Profundidad de la cámara (mm)} \times \text{dilución} \right)^{\times 1000}$$

Análisis de la vitalidad (VI), integridad del acrosoma (AR) y anomalías espermáticas (AE)

Se procedió a tomar una alícuota de 10µL del semen fresco y colocarla en una lámina portaobjeto atemperada a 37°C ubicada sobre una platina termo-regulable, donde se mezcló con una cantidad igual de colorante Eosina-nigrosina, inmediatamente se homogenizó suavemente y se hizo un extendido fino (frotis), dejando secar por 30 min. Para determinar la VI, los frotis se observaron en el microscopio óptico (Globe®, LEM 1600, Alemania) con el objetivo de inmersión 1000X y se cuantificó un total de 100 espermatozoides con el fin de valorar el porcentaje de espermatozoides vivos en la muestra seminal. Posteriormente, los mismos frotis fueron utilizados para medir la AR, donde se cuantificaron 100 espermatozoides y se clasificaron según su apariencia en normales (acrosoma no reaccionados) y anormales (acrosoma reaccionado o desaparecido), para expresar el resultado en función del porcentaje de espermatozoides reaccionados.

Los mismos frotis utilizados para la valoración de VI y AR fueron utilizados para determinar las AE presentes en las muestras. Los frotis fueron observados en un microscopio óptico con el objetivo de inmersión a un aumento de 1000X y se procedió a contar un total de 100 espermatozoides en varios campos del frotis para determinar el porcentaje de atipias presentes en la muestra. Las anomalías observadas fueron clasificadas en primarias y secundarias según la clasificación descrita por Barth y Oko [5].

Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante el Statistical Analysis System software 8.2, para Windows [32]. En primera instancia se realizó una caracterización de los parámetros o variables evaluadas indicativas de calidad seminal (CES, VL, CE, MM, MI, VI, AR y AE) y se complementó aplicando el procedimiento GLM del SAS para ajustar los valores medios obtenidos en función del efecto toro y el efecto semana. Para el análisis estadístico, el nivel de significancia se estableció en $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la evaluación de las características seminales de 10 toros CL durante cuatro semanas consecutivas en semen fresco para un total de 40 evaluaciones (1/semana/toro). El valor promedio de CES fue de $34,40 \pm 0,43$ cm, el VL del eyaculado

fue de $4,43 \pm 0,25$ ml, la MM de $3,2 \pm 0,08$, la MI de $70,50 \pm 0,81$ % y la CE de $839,50 \pm 35,32 \times 10^6$ espermios/mL (TABLA I). El resultado de las evaluaciones de las características seminales del semen fresco de los toros CL permitió clasificar dichas muestras seminales como aptas, ya que se encontraban dentro de los parámetros de CS establecidos para bovinos [9].

La CES observada en los toros CL se pueden considerar aceptables para esta raza, aseveración basada en valores obtenidos en toros derivados de razas criollas latinoamericanas, incluso también están reportados para toros de razas españolas y/o europeas de dimensiones pequeñas a medianas [12, 33]. Hay que enfatizar que solo se encontró una referencia [19] para esta raza con resultados similares (33,5; 32,7 y 32,7 cm) a las encontradas en este estudio. Valores similares de CES fueron reportados para toros de las razas Colombianas Criollo Costeño con Cuerno ($34 \pm 1,2$ cm) y Romosinuano ($33 \pm 1,4$ cm) y en ganado criollo Encerado de Ecuador (33 ± 3 cm) [1, 27]. La evaluación de la CES en los toros es de suma importancia, ya que existe una correlación entre este parámetro con la CE [3] y con la edad en que los hijos e hijas de los toros alcanzan la pubertad [11]. Según los valores observados en este trabajo, estos animales presentan una CES muy cercanos a lo recomendado por la SATV, según la edad referenciada en este trabajo [9].

El VL del eyaculado tuvo un promedio de $4,43 \pm 0,25$ mL (TABLA I), este valor se encuentra dentro del rango normal para los bovinos (3-15 mL) [22]. Valores similares fueron reportados [19] en un estudio en toros CL durante varias épocas del año, observándose que la época del año no afecta el VL del eyaculado. En toros de la raza Criollo Encerrado se han reportado VL de eyaculado de $14 \pm 2,7$ mL [1], el cual deriva de la sumatoria de

tres extracciones, a diferencia de este estudio donde el volumen reportado es el producto de un solo salto. En toros criollos Costeño con Cuerno y Romosinuano [27] se reportaron volúmenes ligeramente inferiores ($3,9 \pm 1,4$ y $3,5 \pm 1,1$ mL) a los encontrados en los CL; sin embargo, igualmente están dentro del rango normal para bovinos. Valle y col. [27] obtuvieron valores parecidos al del presente estudio en otras razas *Bos taurus* en Venezuela, como Holstein y Pardo Suizo ($4,25 \pm 2,13$ y $4,21 \pm 1,80$ mL). Es importante tener en cuenta que el VL eyaculado puede variar entre el mismo individuo y de un individuo a otro debido a múltiples factores derivados del grupo genético al cual pertenecen, edad, época del año, método y frecuencia de colección, calidad de la alimentación y el tiempo de excitación sexual previo a la eyaculación [18], por lo cual no es extraño conseguir estas variaciones en cuanto al VL eyaculado entre los diferentes estudios. Salisbury y col. [31] reportaron que no existe una correlación entre el VL eyaculado y el potencial reproductivo de los toros, por lo cual, las posibles variaciones observadas en el VL eyaculado no son de gran importancia.

El valor promedio de la CE del semen fresco de los toros CL fue de $839,50 \times 10^6 \pm 35,32 \times 10^6$ espermios/mL (TABLA I). Esta CE se encuentra dentro del rango establecido para la especie bovina (800 a 2000×10^6 espermios/mL) [17]. Los valores de CE obtenidos en este estudio son ligeramente superiores a los referenciados por Aguirre y col. [1] en toros criollos Encerados ($745 \times 10^6 \pm 180 \times 10^6$ espermios/mL), pero inferiores a los encontrados en CL por Madry-Bury y col. [19] durante varias épocas del año, encontrando los valores más bajos en la época de mayor temperatura ambiental ($1087,6 \times 10^6 \pm 38,3 \times 10^6$ espermios/mL), sin embargo, sus valores fueron más altos a los de este estudio. Ese mismo efecto de la

TABLA I
PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL EN SEMEN FRESCO DE TOROS CRIOLLO LIMONERO (M \pm EE)

Toro	Parámetros				
	CES (cm)	VL (ml)*	CE ($\times 10^6$)*	MM (1-5) *	MI (%)*
1	37,0	$4,12 \pm 0,55$	$972,5 \pm 125,25$	$3,25 \pm 0,25$	$70,50 \pm 2,04$
2	35,0	$4,25 \pm 0,32$	$850,0 \pm 187,70$	$3,25 \pm 0,25$	$71,25 \pm 2,39$
3	35,0	$6,50 \pm 0,79$	$947,5 \pm 52,02$	$3,25 \pm 0,25$	$73,75 \pm 3,14$
4	34,0	$5,12 \pm 0,92$	$847,5 \pm 120,85$	$3,75 \pm 0,25$	$71,25 \pm 1,25$
5	32,0	$4,12 \pm 0,23$	$855,0 \pm 44,06$	$3,50 \pm 0,28$	$65,00 \pm 2,04$
6	35,0	$4,25 \pm 0,32$	$700,0 \pm 136,93$	$3,25 \pm 0,25$	$68,75 \pm 1,25$
7	27,0	$5,87 \pm 0,82$	$742,5 \pm 71,80$	$2,25 \pm 0,25$	$73,75 \pm 3,14$
8	33,0	$3,37 \pm 0,68$	$880,0 \pm 140,71$	$3,00 \pm 0,15$	$67,50 \pm 1,44$
9	31,0	$4,62 \pm 0,47$	$885,0 \pm 80,05$	$3,25 \pm 0,25$	$70,00 \pm 2,88$
10	35,0	$2,12 \pm 0,42$	$715,0 \pm 126,26$	$3,25 \pm 0,25$	$73,75 \pm 3,75$
M \pm EE	$33,4 \pm 0,43$	$4,43 \pm 0,25$	$839,5 \pm 35,32$	$3,20 \pm 0,08$	$70,50 \pm 0,81$
Valor de referencia	≥ 34 [9]	4-6 [22]	800-2000 [17]	≥ 2 [9]	≥ 60 [9]

*P>0,05.

CES= circunferencia escrotal; VL= Volumen; CE= Concentración espermática, MM= Motilidad masal; MI= Motilidad individual progresiva. Valor de referencia dentro de corchetes se refiere a una cita bibliográfica.

época del año fue observada en toros de razas *Bos taurus* en Venezuela [35]. Palmieri y col. [27] también refirieron CE más elevadas en toros autóctonos Colombianos Criollo Costeño con Cuerno y Romosinuano ($1009 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$ y $1.013 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ espermios/mL) que las obtenidas en este estudio. Las CE en el semen pudiesen no afectar la fertilidad de un toro, siempre y cuando no se aleje del límite inferior establecido para la especie y que además exista un alto porcentaje de espermatozoides con características normales [2].

La evaluación de la motilidad en el semen fresco se realizó mediante la determinación subjetiva de la MM y la MI, ambos parámetros son claves y requeridos por la SATV para valorar el potencial reproductivo de un toro [9]. Según los valores encontrados para la MM y MI ($3,2 \pm 0,08$ y $70,50 \pm 0,81\%$) el semen evaluado de los toros CL puede clasificarse como óptimo. Al comparar esta investigación con la ya reportada [19] se puede evidenciar que ellos refirieron valores ligeramente superiores de MM por época de año ($3,8 \pm 0,1$; $3,2 \pm 0,1$ y $3,7 \pm 0,1$), pero inferiores de MI ($65,5 \pm 1,0$; $55,6 \pm 1,5$ y $63,8 \pm 1,6\%$). Valle y col. [35] reportaron valores similares de MM en toros Holstein y Pardo Suizo criados en Venezuela ($2,97 \pm 1,32$ y $2,96 \pm 1,60$), mientras que Aguirre y col. [1] reportaron una MM similar ($3,4 \pm 0,8$) en toros criollos Encerados y una MI mayor ($82,7 \pm 7,1\%$) a los encontrados en el presente estudio. Palmieri y col. [27] observaron motilidades individuales similares en toros Criollos Costeño con Cuerno y Romosinuano ($67 \pm 7,1$ y $68 \pm 8,0\%$). Las variaciones observadas en los valores reportados en los diferentes estudios en cuanto a la MM y MI pueden deberse a la subjetividad con la cual se realizan las evaluaciones de estos parámetros, pudiendo variar el criterio de evaluación entre un evaluador y otro. De las evalua-

ciones realizadas para la motilidad espermática en el semen fresco, la MI es la más importante, se han reportado estudios donde indican que existe una correlación positiva entre el movimiento rectilíneo progresivo de los espermatozoides y la fertilidad [10, 28]. Chenoweth y col. [9] señalan que toros con una MI inferior a 30% no deben ser seleccionados como futuros reproductores en los centros de IA. Los toros evaluados en este trabajo están muy por encima del valor mínimo establecido que recomienda dicho autor.

Posteriormente, a cada una de las muestras de semen fresco evaluada se les realizó un frotis con Eosina-nigrosina para la valoración de VI, AE y AR, obteniéndose valores promedios de $72,77 \pm 1,46$; $14,07 \pm 0,77$ y $24,47 \pm 3,94\%$, respectivamente (TABLA II). No se detectaron diferencias significativas entre cada uno de los toros evaluados ($P > 0,05$) para ninguna de las variables antes mencionadas; sin embargo, se observan diferencias matemáticas entre alguno de los toros para las variables estudiadas, estas diferencias matemáticas obedecen a que se observó una gran variabilidad en alguno de los toros en las diferentes muestras evaluadas. Es importante destacar que los valores obtenidos están dentro de los parámetros aceptados de calidad de semen fresco para la especie [9].

Madrid-Bury y col. [19] observaron valores de AE inferiores al 10% en toros CL. Aguirre y col. [1] encontraron un porcentaje similar de anomalías espermáticas en toros criollo Encerado ($12,4 \pm 2\%$), mientras que Palmieri y col. [27] refirieron valores ligeramente superiores de AE en toros Criollo Costeño con Cuerno y Romosinuano ($18 \pm 7,7$ y $20 \pm 8,5\%$). Chenoweth y col. [9] señalan que un semen fresco de bovinos para que sea de buena calidad debe de tener no más de 30% de AE y al me-

TABLA II
PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL EN SEMEN FRESCO DE TOROS CRIOLLO LIMONERO (M ± EE)

Toro	Parámetros		
	VI (%)*	AE (%)*	AR (%)*
1	77,75 ± 3,85	14,75 ± 3,90	24,50 ± 5,19
2	74,25 ± 2,75	17,50 ± 3,22	24,50 ± 5,25
3	77,25 ± 5,28	12,50 ± 1,93	17,50 ± 7,76
4	74,00 ± 0,81	15,75 ± 3,35	23,25 ± 3,94
5	59,50 ± 3,86	15,00 ± 0,70	33,00 ± 5,83
6	71,75 ± 1,65	14,75 ± 1,25	24,50 ± 4,50
7	74,00 ± 5,21	9,50 ± 3,47	25,50 ± 9,03
8	68,50 ± 3,79	13,75 ± 0,47	27,00 ± 11,04
9	75,00 ± 5,78	15,25 ± 1,10	21,50 ± 6,99
10	75,75 ± 6,88	12,00 ± 2,73	23,50 ± 11,61
M ± EE	72,77 ± 1,46	14,07 ± 0,77	24,47 ± 3,94
Valor de referencia	≥ 60 [9]	≤ 30 [9]	≤ 30 [2]

* $P > 0,05$.

VI= Vitalidad espermática; AE= Anormalidades espermáticas; AR= Acrosomas reaccionados.

Valor de referencia dentro de corchetes se refiere a una cita bibliográfica.

nos un 60% de VI. Valle y col. [35], valorando semen de toros Holstein y Pardo Suizo en Venezuela, observaron VI similares a las encontradas en este estudio ($72,68 \pm 26,31$ y $72,30 \pm 22,03\%$). Solo uno (5) de los 10 toros evaluados en este estudio presentó un valor de VI ligeramente inferior al recomendado para la especie ($59,5 \pm 7,72 \%$), así mismo este toro fue el que obtuvo el valor más bajo de MI ($65 \pm 4,08\%$), aunque este valor aún está por encima del mínimo recomendado para los bovinos. La valoración de la VI resulta de gran importancia al momento de evaluar un semen que se desee congelar, debido a que está descrito que existe una rápida y marcada disminución del número de espermatozoides vivos inmediatamente después de la eyaculación [28], por lo que si se parte de un valor de VI muy bajo el semen criopreservado será de muy baja calidad. En el caso del valor de los AR se encontró que este valor ($24,47 \pm 3,94\%$) se encuentra dentro de los valores sugeridos por Catena y Cabdevila [8] para semen fresco de bovinos ($\leq 30\%$). De los 10 toros evaluados, solo el número cinco obtuvo un valor por encima ($33 \pm 5,83\%$) del valor sugerido para la especie. A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre los toros se observó que los toros números 5 y 8 con los valores de VI más bajos ($59,5 \pm 7,72$ y $68,50 \pm 7,59\%$) presentaban los mayores porcentaje de AR ($33 \pm 5,83$ y $27 \pm 11,04\%$), lo cual podría indicar que un porcentaje importante de los AR estén relacionados con espermios muertos, es decir que sea una pérdida o reacción del acrosoma que se produzca posterior a la muerte de los espermatozoides, lo cual es conocido como falsa reacción acrosomal. La tinción empleada para evaluar el porcentaje de AR en este trabajo no permite distinguir de manera precisa si esa es una falsa reacción acrosomal o una verdadera reacción acrosómica.

Posteriormente, las AE fueron clasificadas en primarias y secundarias (TABLA III). El valor promedio para las AE primarias y secundarias fue de 1,00 y 13,07%, respectivamente. La única AE encontrada en los toros evaluados y clasificada como primarias fue la gota citoplasmática proximal (GCP/ $1,00 \pm 0,18\%$). La mayor parte de las anomalías encontradas en la evaluación del semen corresponden a anomalías secundarias, siendo el flagelo doblado y la cabeza suelta las de mayor porcentaje ($6,00 \pm 0,45$ y $5,07 \pm 0,56\%$). Realizando la sumatoria de las AE observadas en cada una de las diferentes regiones de los espermatozoides [cabeza y flagelo (pieza de

conexión, piezas intermedia, principal y terminal)], las anomalías del flagelo fueron las predominantes (7,75%).

Palmieri y col. [33] observaron valores de AE primarias y secundarias en toros criollos Costeño con Cuerno de 3,8 y 14%, respectivamente; en cambio, en toros Romosinuano observaron valores de 3,4 y 16%. El estudio de las AE es de gran importancia dentro de la evaluación del semen fresco, ya que hay investigaciones que demuestran la existencia de una relación positiva entre el porcentaje de espermatozoides normales presentes en un eyaculado y la fertilidad de los toros [6, 21, 26, 29]. Las AE secundarias observadas con mayor frecuencia en el semen evaluado fueron las cabezas sueltas (5,07%) y anomalías de flagelo (flagelo doblado 6% y flagelo enrollado 1,75%). Estas AE secundarias son producto de una alteración a nivel del epidídimo, las cuales podrían estar relacionadas con estrés calórico [24,30]. Recientemente, Nava-Trujillo y col. [25] demostraron que existe una correlación entre el daño de la cromatina y las AE de la cabeza de los espermatozoides, especialmente en las cabezas sueltas, donde observaron que un $13,09 \pm 2,44\%$ de las cabezas sueltas presentaban daño de la cromatina, mientras que solo un $0,62 \pm 2,67\%$ poseía la cromatina intacta, esto sugiere que este tipo de anomalía pueden originarse durante la espermatogénesis a nivel testicular, por lo cual habría que indagar al respecto y en caso de ser esta la causa de AE en toros CL se tendría que reclasificar como primaria. A pesar de que ese tipo de AE fueron los de mayor frecuencia, son inferiores a los valores límites aprobados para descartar un eyaculado de toro. Es conocido que se puede aceptar hasta un 20% de AE de cabeza y hasta un 25% de AE de flagelo [9].

CONCLUSIONES

Las características seminales del semen fresco de los toros CL se encuentran dentro de los parámetros establecidos para la especie bovina y las observadas en otras razas criollas latinoamericanas, observándose gran homogeneidad entre los toros evaluados. Estos resultados permiten considerar el semen de los toros CL estudiados como de buena calidad, lo cual lo hace apto para ser sometido a la criopreservación y utilización en planes de conservación y difusión de este tipo de ganado.

TABLA III
VALORES MEDIOS DE LAS PRINCIPALES ANORMALIDADES PRIMARIAS Y SECUNDARIAS OBSERVADAS EN SEMEN FRESCO DE TOROS CRIOLLO LIMONERO

Primarias	Anormalidades espermáticas (%)		
	(M ± EE)	Secundarias	M ± EE
Gota citoplasmática proximal	$1,00 \pm 0,18$	Cabeza suelta	$5,07 \pm 0,56$
		Flagelo doblado	$6,00 \pm 0,45$
		Flagelo enrollado	$1,75 \pm 0,32$
		Gota citoplasmática distal	$0,25 \pm 0,10$
Total anomalidades (%)	1,00	Total anomalidades (%)	13,07

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) por todo el apoyo logístico y económico brindado para la realización de este trabajo. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ, proyecto CC-0056-13) por el co-financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGUIRRE, L.; UCHUARI, M.; BRICEÑO, P. Evaluación fenotípica y seminal con fines de conservación del bovino "Encerado" presente en la región alto andina del Ecuador. **AICA**. 2: 185-189. 2012.
- [2] AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. **J. Androl.** 14: 397-406. 1993.
- [3] ARANGUREN-MENDEZ, J.A.; MADRID-BURY, N.; GONZALEZ-STAGNARO, C.; RINCÓN, E.; RAMIREZ, L.; QUINTERO-MORENO, A. Pubertad en toretes 5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo. **Rev. Fac. Agro. (LUZ)**. 12: 393-407. 1995.
- [4] BARRATT, C.L.; TOMLINSON, M.J.; COOKE, I.D. Prognostic significance of computerized motility analysis for *in vivo* fertility. **Fertil. Steril.** 60: 520-525. 1995.
- [5] BARTH, A.D.; OKO, R.J. Defects of the Sperm Head/ Defects of the Sperm Tail. In: **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University Press Ames. 285 pp. 1989.
- [6] BARTH, A.D. Relationship between sperm abnormalities and fertility. In: **Proceedings 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**, Milwaukee. 04/12-14. USA. Pp 47-63. 1992.
- [7] BRACHO, I.G.; CONTRERAS, M.P.; ZAMBRANO, S. La Raza Criollo Limonero: Una realidad para la Ganadería de Doble Propósito. En: **Avances en la Ganadería Doble Propósito**, C. González-Stagnaro, E. Soto Belloso, L. Ramírez Iglesia (Eds.). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo-Venezuela. Pp 11-25. 2002.
- [8] CATENA, M.; CABODEVILA, J. Evaluación de semen bovino congelado. **Taurus**. 1(3): 18-31. 1999.
- [9] CHENOWETH, P.J.; HOPKING, F.M.; SPITER, J.C.; LARSEN, R.E. Guidelines for using the bull breeding Soundness Evaluation form. **Theriogenology Handbook B-10**. Hasting NE: SFT. Pp 1-5. 1993.
- [10] CHRISTENSEN, P.; STENVANG, J.; GODFREY, W.L. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. **J. Androl.** 25: 255-264. 2004.
- [11] CULTER, G. Scrotal circumference. A review. Proc. Ann. Met. Soc. **Theriogenol.** 35:113-117. 1991.
- [12] DELGADO, C.; VALERA, M.; MOLINA, A.; JIMÉNEZ, J.; RODERO, A. Circunferencia escrotal como predictor de la capacidad reproductiva en razas de vacuno de carne autóctono: Curva de crecimiento en el vacuno Retinto. **Arch. Zoot.** 49: 229-240. 2000.
- [13] EWEL, J.J.; MADRIZ, A.; TOSI, J.A. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. En: **Zonas de vida de Venezuela**. FONAIAP. Caracas, Venezuela. 265 pp. 1976.
- [14] FLORIO, J. El ganado Criollo Limonero un potencial para la ganadería doble propósito en Venezuela. **Rev. Agroserv.** 7(17): 60-62. 2006.
- [15] FLORIO, J. Uso de los bovinos criollos en cruzamientos con otras razas bovinas en América Latina, con énfasis en Ganadería Doble Propósito. En: **Desarrollo Sostenible de la Ganadería Doble Propósito**, C. González-Stagnaro, E. Soto Belloso (Eds.). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo-Venezuela. Pp 116- 126. 2008.
- [16] FLORIO, J.; CONTRERAS, G.; ZAMBRANO, S.; FAJARDO, J.; FUENMAYOR, A. Programa nacional de preservación y mejoramiento genético de la raza Criollo Limonero en la República Bolivariana de Venezuela. **AICA**. 1: 117-122. 2011.
- [17] GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S. Espermatozoides y plasma seminal. En: **Reproducción e Inseminación Artificial en Animales**. ES. Hafez (Ed). 7^{ma} Ed. Editorial McGraw Hill Interamericana, México. Pp 3-12. 2000.
- [18] 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.
- [19] MADRID-BURY, N.; HERNÁNDEZ, A.; YAÑEZ-CUELLA, F.; ARANGUREN-MENDEZ, J.; GONZÁLEZ-STAGNARO, C. Efecto de la época sobre las características seminales de los toros Criollo Limonero. **ITEA**. 20(2): 600-602. 1999.
- [20] MADRID-BURY, N. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. En: **Reproducción Bovina**. C. Gonzalez-Stagnaro (Ed.). Ediciones Astro Data SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Pp 263-278. 2003.
- [21] MADRID-BURY, N.; PÉREZ, J.; PÉREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, J. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenol.** 64: 232-241. 2005.
- [22] MADRID-BURY, N. Manejo y determinación de la aptitud reproductiva del toro. En: **Selección y manejo de machos bovinos**, N. Madrid-Bury (Ed.) Ediciones Astro Data SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Pp 147-160. 2010.

- [23] MADRID-BURY, N.; GONZÁLEZ-STAGNARO, C.; ARANGUREN-MÉNDEZ, J.A.; YANEZ, F.; QUINTERO-MORENO, A. Comportamiento sexual en toros Criollo Limonero. **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**. 28(1): 505-513. 2011.
- [24] MEYERHOEFFER, D.; WETTEMANN, R.; COLEMAN, S.; WELLS, M. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperatura. **J. Anim. Sci.** 60(2): 352-357. 1985.
- [25] NAVA-TRUJILLO, H.; HERNÁNDEZ-FERNANDEZ, A.; QUINTERO-MORENO, A. Integridad de la cromatina y forma de la cabeza del espermatozoide de toro: evaluación simultánea con la tinción de azul de toluidina. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. XXXI (3): 211- 216. 2012.
- [26] PALACIOS, C. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. **Memorias Posgrado de Reproducción Bovina**. Biotecnología Reproductiva, C.G.R®. Colombia. Pp 235-242. 2005.
- [27] PALMIERI, R.; DALADIER, S.; AMADO, E.; MARCO, G.; ESPERANZA, P. Variables seminales en toros Criollos Colombianos Costeño con Cuernos y Romosinuano. **MVZ-Córdoba**. 9(1): 381-385. 2004.
- [28] RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. 2000. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York, USA. En línea:http://www.ivis.org/advances/Repro_Chenoweth/Rodriguez_Martinez_es/chapter.asp?LA=2. 27/10/2014.
- [29] SAACKE, RG. Sperm Morphology: Its relevance to compensable and uncomplensable traits in semen. **Theriogenol.** 70(3): 473-478. 2008.
- [30] SALAH, M.; EL-NOUTY, F.; AL-HAJRI, M. Effect of season on seminal characteristics of Holstein bulls under semi-arid environment. Sperm abnormalities. **AJAS**. 5(3): 449-454. 1992.
- [31] SALISBURY, G.N.; VANDEMARK, L.; LODGE, J.R. Ovogenesis, ovulation and fertilization. In: **Physiology of reproduction and Artificial Insemination of Cattle**. 2^{da}. Ed. San Francisco. U.S.A. Pp 91-129. 1978.
- [32] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). User's Guide. Release 6.12. Cary, NC. 2002.
- [33] SUNDARARAMAN, M.N.; THANGARAJU, P.; EDWIN, M.J. Age related changes in testes size of Jersey bulls and its effects on semen production traits. **Indian J. Anim. Sci.** 72:567-568. 2002.
- [34] TEWOLDE, A. Los Criollos bovinos y los sistemas de producción animal en los trópicos de América Latina. En: **Simposio sobre Utilización de Razas y Tipos Bovinos creados en Latinoamérica y el Caribe**. Maracaibo 10/23. Venezuela: Pp 12-18. 1997.
- [35] VALLE, A.; FUENTES, A.; PUERTA, M. Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo Suizo nacidos en el trópico. **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**. 22: 52-61. 2005.