

## Características seminales del Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*)

### Seminal characteristics of water buffalo (*Bubalus bubalis*)

Sergio A. Canizales

Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Estudiante de Maestría en Reproducción Animal, Maracaibo–Venezuela.

sergio.canizales@fcv.luz.edu.ve

#### Resumen

*La evaluación seminal de búfalos constituye en la actualidad una herramienta imprescindible para el desarrollo de programas de mejora genética destinados a aumentar las producciones ganaderas. Esta revisión pretende ofrecer una visión de las características del semen de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), en donde se muestran los diversos indicadores de semen, y las diferentes pruebas especiales para evaluar el mismo.*

*Palabras clave: búfalo, evaluación, indicadores, semen*

#### Abstract

*Buffalo seminal assessment is now an indispensable tool for the development of breeding programs aimed at increasing livestock production. This review aims to provide an updated view of the semen characteristics of water buffalo (*Bubalus bubalis*) showing the various indicators of semen, and various special tests to evaluate it.*

*Keywords: buffalo, assessment, indicators, semen*

#### Introducción

El búfalo de agua es nativo de Asia, la especie *Bubalus bubalis* sp, incluye 19 razas, sin embargo, las cuatro razas más conocidas mundialmente son Carabao, Mediterránea, Murrah y Jafarabadi. En los últimos 10 años, el rebaño de búfalos a nivel mundial ha presentado una tasa de crecimiento de 9,1 %, y la producción de leche de esta especie aumento 70,6 % (FAO, 2006).

En este contexto, la inseminación artificial (IA), es indispensable para el mejoramiento de la especie. La evaluación precisa de la fertilidad de búfalos destinados a la inseminación artificial (IA) es de suma importancia porque una sola eyaculación puede ser la dosis de varias inseminaciones, que influirán en el potencial reproductivo de un rebaño (Baruselli y Carvalho, 2006).

En numerosas investigaciones se ha enfatizado en la relación que existe entre los parámetros seminales tradicionalmente empleados (motilidad progresiva, morfología espermática e integridad acrosómica) y las pruebas especiales in vitro basadas en las características funcionales que les permiten a los espermatozoides lograr la fecundación. La importancia de los resultados obtenidos en estas pruebas y su relación con la fertilidad se centra

en que toman en consideración la capacidad del espermatozoide para realizar el proceso de capacitación, la reacción acrosómica y el propio acto de la fecundación.

Considerando que en la correcta realización de estos procesos radica la capacidad fecundante de los espermatozoides, y que estas capacidades espermáticas no pueden ser estimadas por las variables seminales utilizadas tradicionalmente en los centros de inseminación artificial se hace necesaria la investigación profunda de estos fenómenos y la implementación de nuevos métodos predictores de la fertilidad del semental bufalino (Andrabi, 2008).

El objetivo de esta revisión es presentar resultados de investigaciones y conocimientos existentes en la literatura sobre las características seminales del Búfalo de agua, con el fin de optimizar la aplicación de las biotecnologías de la reproducción en rebaños bufalinos destinados a la producción de leche y carne.

Actualmente, la población bufalina mundial ronda los 170 millones de cabezas, siendo Asia el continente que concentra la mayor cantidad de búfalos (Tabla 1).

Tabla 1. Producción bufalina de diferentes regiones geográficas y país

País	Población en millones	(%)
Sur de Asia: India Pakistán	123	(72,3)
Sur Oeste de Asia: China	38	(22,1)
África y Europa: Egipto	4	(2,8)
América Latina y el Caribe	4	(2,8)
Brasil	3,5	
Venezuela	0,140	
Argentina	0,100	
Colombia	0,80	
Total población mundial	170	

Fuente: FAO, (2006)

Para considerar a un butoro apto reproductivamente, asumiendo que es un animal clínicamente sano, debe cumplir con tres requisitos básicos, como son: a) buena libido, b) buen estado clínico reproductivo y c) buena calidad espermática. La evaluación del semen es un punto importante para la certificación de la aptitud reproductiva en un butoro.

### Colecta de semen

El semen se puede coleccionar por medio de electro-eyacuación o vagina artificial y es obtenido en un tubo graduado de 15 ml aproximadamente, ya sea plástico o de vidrio, para facilitar la medición del volumen. Se debe tener en cuenta de cubrir el tubo con un protector para evitar que, tanto los rayos UV como los cambios bruscos de temperatura afecten al semen (Nordin et al., 1990).

Según Álvarez (2003) y Koonjaenak y Rodríguez (2007), la mejor manera de obtener las muestras de semen es utilizando una vagina artificial con una temperatura entre 40° C y 42°C. El macho bufalino es tal vez de las especies domésticas más fácil de entrenar para tomar semen, especialmente con vagina artificial y usualmente el semental bufalino eyacula en la vagina en el primer intento.

Sansone (2000), encontró que 2 eyaculados sucesivos, cada 3-4 días a partir de los 30 meses de edad produjeron mayor volumen del eyaculado y producción de espermatozoides. Al respecto Vale (2006), encontró que un semental bufalino que ha agotado su reserva seminal por excesivos servicios, necesita alrededor de una semana para reponerla. Cuando a los machos bufalinos se les permite el servicio una o dos veces por día durante períodos cortos, el descanso nocturno es suficiente para restaurar el número original de espermatozoides.

Según Vale (2006), no hay evidencias que la fertilidad se reduzca por esta frecuencia de eyaculaciones. Los

butoros se pueden servir diariamente y aún con mayor frecuencia durante períodos limitados y retener un alto nivel de fertilidad. Un macho bufalino puede ser subfértil durante períodos de una a cuatro semanas después de situaciones de estrés producidas por calor, fiebre o enfermedades agudas (Vale, 2006).

### Evaluación del semen fresco

Las pruebas de laboratorio para evaluar la calidad seminal, según Háfez (1996), resultan ser parámetros objetivos y subjetivos de sus características, que permiten predecir la fertilidad de una muestra de semen. Spitzer (2000) define como aspectos inmediatos después de colectada la muestra, la revisión de la motilidad, volumen, aspecto, pH, concentración.

Igualmente Barth y Tribulo (2000) señalan que exámenes más detallados implican determinación de células anormales, tinción de vivos y muertos, actividad metabólica y resistencia a condiciones medioambientales. El hecho de que estas técnicas convencionales de evaluación seminal carecen de repetibilidad satisfactoria (Den Daas 1992) ha derivado en el desarrollo de nuevas técnicas que evalúen el estado funcional de organelas (acrosoma y las mitocondrias) y la integridad celular de la membrana plasmática o la cromatina de las células espermáticas.

### Examen Macroscópico

#### Color y Densidad

El color y la densidad del semen dependen de variaciones en la concentración de espermatozoides (Tabla 2). El semen varía generalmente de un color blanco lechoso a color crema, con un ligero matiz de azul; con una densidad del semen que varía desde un acuoso, lechoso, lechoso-cremoso, hasta un cremoso. Vale (1994) encontró diferencias significativas de densidad

entre espermatozoides muertos y vivos. Al respecto Koonjaenak y Rodríguez (2007) encontraron diferencias significativas en el color y la densidad del semen del reproductor bufalino. Estas se vieron afectadas por la edad del butoro.

Tabla 2. Relación subjetiva entre concentración y densidad de espermatozoides en búfalos

Calificación	Densidad	Concentración (esp X 10 <sup>9</sup> /ml)
Muy Buena	Creimoso, Espeso	≥1.000
Buena	Lechoso	700-1.000
Regular	Leche aguachenta	400-700
Mala	Translucido	≤ 400

Fuente: Rodríguez, (2007)

## Volumen

El volumen del semen se debe medir inmediatamente después de su colecta. Varía, dependiendo de la raza, edad, tamaño, saltos, métodos de recolección, factores nutricionales, sanitarios y medio ambientales (Nazir, 1988). Vale, 1994; Almaguer et al 2007, plantean que al momento de la pubertad el volumen es alrededor de 1 ml y se incrementa hasta 3 ml después de la madurez. Koonjaenak y Rodríguez 2007, encontraron de 3 a 4 ml de volumen de eyaculado en raza Nili-Ravi, el cual se asemeja a lo descrito por Sajjad et al., (2007). El volumen del eyaculado varía dependiendo de la edad del butoro, encontrándose un aumento de volumen mayor a la edad de 4 a 12 años (Pant et al., 2003).

Javed et al., (2000) no observaron diferencias significativas en el volumen del semen del butoro de diferentes edades. Sin embargo, fue relativamente alta en los butoros adultos (8-9 años), seguido de los butoros de edad (12-15 años de edad). Nordin et al., (1990) también encontró un mayor volumen de eyaculación en butoros adultos, que en jóvenes.

## pH del semen

Se evalúa extrayendo una gota de semen del tubo y colocándola sobre una tira indicadora de pH o en su defecto con un pH-metro digital. El semen tiene un pH dentro del rango de 6,4-7,0 (Rattan, 1990; Kumar et al., 1993; Aguiar et al, 1994., Vale, 1997). Koonjaenak y Rodríguez (2007), Sajjad et al., (2007) encontraron un pH promedio entre 6,9-7,0.

## Examen Macroscópico

Para evitar las alteraciones técnicas por choque de frío, al momento de evaluar la muestra microscópicamente, deben mantenerse las láminas sobre las cuales se coloca la muestra a 37 °C a fin de evitar que se afecte durante la observación del análisis microscópico.

## Motilidad Masal

La motilidad masal es el resultado de la concentración espermática, el porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides, lo cual provoca movimientos de flujo y ocurrencia de verdaderas olas de espermios. La observación se hace sobre una gota de semen de 5 a 10 µL colocada sobre un porta objetos a 37°C y sin cubrir objetos en donde se observan en olas y remolinos del semen. Las ondas más oscuras y densas son señal de una alta concentración de espermatozoides.

La observación se realiza, con semen sin diluir y bajo un campo luminoso y con un aumento de 10x observando varios campos microscópicos (Nazir, 1988). Se debe evaluar cerca del borde de la gota, donde la profundidad de la misma es menor y es más fácil de observar. La escala que se toma para evaluarla es de 0 a 100% con un criterio evaluativo de 1 a 4 cruces (Tabla 3), en donde 1 es ausencia de movimiento y 4 es máximo movimiento. Un semen de buena calidad no debe tener una motilidad masal menor a 3.

Tabla 3. Escala basada en el porcentaje de células móviles y criterio evaluativo

Valor Descriptivo (%)	Aspecto del modelo Criterio	Células móviles	
Evaluativo			
Muy buena	Movimiento en ondas vigorosas y en remolinos rápidos	80 – 90	++++
Buena	Remolinos y ondas más lentas	60 – 80	+++
Regular	Sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas	40 – 60	++
Mala	Escasa o ninguna motilidad	0 – 40	+

Fuente: Koonjaenak y Rodríguez, (2007)

En las diferentes investigaciones la motilidad masal fluctúa entre 2 y 3 cruces (40-80%) encontrándose diferencias debido básicamente a la edad del animal, la época y frecuencia de colecta (Nazir, 1988; Aguiar et al., 1994; Barth, 2000; Koonjaenak y Rodríguez, 2007).

### Motilidad individual

La motilidad individual según Barth (2000) es el resultado de la evaluación del movimiento progresivo de los espermatozoides y de los cambios en su motilidad. Este seguimiento se hace en una lamina perfectamente limpia y una gota de 3 a 4 mm de semen diluido y colocando una laminilla encima. Debe ser observada en un aumento de 200 x – 500 x, preferentemente bajo contraste de fase, y los resultados se expresan en porcentaje o en una escala de 1 a 5. La clasificación se muestra bajo parámetros que se muestran en la Tabla 4.

Sajjad et al., (2007) en sementales raza Nili-Ravi entre 12 y 15 años encontraron una motilidad individual de  $(51,53 \pm 2,23)$ ; Similares resultados encontraron Javed et al., (2000) en búfalos Nili-Ravi de 12-15 años de edad  $(56,89 \pm 0,65)$ . Suryaprakasam y Rao (1993); Kumar et al., (1993); Younis (1996) reportan una motilidad (>60 %) en raza Murrah y Nili-Ravi.

Sin embargo, Koonjaenak y Rodríguez (2007) reportan una motilidad individual progresiva de espermatozoides de 65 % a 80 % en sementales bufalinos Nili-Ravi de 6 -18 años. En el trópico Americano, Aguiar et al., (1994) observaron  $78,6 \pm 5,6$  % de espermatozoides móviles en estados brasileños de Minas Gerais y Bahía.

La diferencia en la motilidad espermática puede ser debido a la temporada de toma de muestras, edad del semental, a la lectura subjetiva y al número de animales estudiados.

Tabla 4. Escala basada en el porcentaje de células móviles

Valor Descriptivo	% células móviles
Muy buena	80 – 100
Buena	60 – 79
Regular	40 – 59
Mala	≤ 40

**Fuente:** Kumar et al., (1993)

La evaluación subjetiva de la motilidad de los espermatozoides se realiza de manera rutinaria. El resultado depende en gran medida de la experiencia del operador, lo que implica una variación entre las estimaciones adecuadas de los posibles problemas de fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2003). A fin de disminuir esta variación, se ha desarrollado durante las últimas dos décadas el Análisis del Semen Auxiliado por Computador (CASA).

### Análisis computarizado del semen (CASA)

Las técnicas tradicionales de evaluación de la motilidad masal, porcentaje de móviles y motilidad progresiva, a pesar de ser usuales, rápidas y prácticas y que requieren equipos simples, presentan un fuerte carácter subjetivo debido a que están sujetas a las diferentes interpretaciones entre examinadores (Rodríguez-Martínez, 2003).

Su ventaja radica en ser “objetiva” evalúa la motilidad de los espermatozoides, también evalúa la cinemática de los espermatozoides (Januskauskas et al., 1999; Hallap et al., 2004). Los sistemas CASA permiten la detección de cambios súbitos en el movimiento espermático y una mejora en la calidad de los estudios a nivel de laboratorio.

### Concentración de espermatozoides

El número de espermatozoides se expresa por milímetro cúbico, para la determinación se usan métodos tales como: cámara de Neubauer, la espermio-densimetría y la espectrofotometría (Pant et al., 2003). Tiene una gran variación (600 – 1500 millones de células por ml) y este parámetro está afectado por condiciones estacionales, nutricionales y edad del semental bufalino (Lohachit, 1984).

La mayoría de las mediciones de rutina de la concentración son hechas por un espectrofotómetro. En sementales bufalinos criados en Bahía- Brasil se observaron concentraciones de  $1166,3 \pm 17,5 \times 10^6$  espermatozoides/ml (Aguiar, 1994). En búfalos Murrah criados en la India, Kumar et al., (1993) observaron concentraciones de  $524,1 \pm 20,7$  hasta  $1031,4 \pm 28,7 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Resultados similares se observaron por Rattan (1990) y en raza Nili-Ravi, Koonjaenak y Rodríguez (2007).

Javed et al., (2000) observaron menor concentración de espermatozoides en sementales bufalinos mayores que en los más jóvenes. Sin embargo, Younis (1996) encontró una diferencia no significativa en la concentración del esperma entre búfalos jóvenes y adultos. La menor concentración de espermatozoides en los machos viejos podría ser debido a la senilidad (Javed et al., 2000).

### Vitalidad y Morfología

Con esta prueba se valora el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos en un eyaculado, aunque indirectamente se está valorando la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide. La tinción que se usa de preferencia es la eosina-nigrosina. En un portaobjetivo previamente temperado a  $37-38^{\circ} \text{C}$ , se mezclan 5  $\mu\text{L}$  de semen con 15  $\mu\text{L}$  del colorante con eosina-nigrosina y se deja actuar por 30 segundos. Se elabora un frotis

que se deja secar al calor, observando al microscopio óptico de luz con aumento de 40x. Los espermatozoides vivos y con la membrana plasmática intacta no permitirán el paso de la eosina dentro de la célula y lucirán al microscopio de color transparente, mientras que en los muertos, con pérdida funcional de la membrana se observa la región postacrosomal de color morado. Se considera como valor mínimo aceptable, el 70 % de espermatozoides vivos (Koonjaenak et al., 2007).

## Morfología

Valora el porcentaje de espermatozoides anormales y normales en una muestra determinada. Palacios (2005) señala que la morfología espermática es un factor determinante en la capacidad de fertilización del semen, ya que existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad.

Los espermatozoides contienen algunos defectos de conformación, estas anomalías se deben a espermatogénesis o espermiogénesis defectuosas por herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones medio ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de 60 días), así como técnicas inadecuadas de la manipulación del semen (Saeed et al., 1994).

La mayoría de las investigaciones que evalúan las anomalías del acrosoma, lo realizan mediante el uso de la coloración de Giemsa (Ramakrishnan y Ariff, 1994). Más del 90 % de espermatozoides se observaron con acrosoma intactos en el semen de semental Murrah evaluados con tinción de Giemsa (Aguiar, 1994; Kumar, 1993). Talevi, et al., (1994) reportó resultados similares con fluorescencia de lectina.

En estudios de Saeed et al., (1994) en butoros de raza Murrah, la mayoría de las anomalías se encontraron en las cabezas de los espermatozoides ( $5,78 \pm 2,1$  %), mientras que anomalías en la pieza intermedia fueron menos del 1 % y las colas anormales varió de ( $3,92 \pm 1,0$  %) hasta ( $5,7 \pm 0,4$  %). La aparición de gota citoplasmática fue inferior al 1 %. Proporciones similares de anomalías fueron observadas en el semen de los búfalos Murrah de Brasil (Aguiar et al., Kumar, 1993).

Sajad et al., (2007) en sementales Nili-Ravi con edades comprendidas entre los 12 y 15 años registraron anomalías de  $11,67 \pm 0,90$  % encontrando similitud a los resultados de Saeed (1990). Estas observaciones indican que las anomalías del esperma en el semen de búfalos de 12-15 años de edad se encuentran dentro del límite aconsejado.

Koonjaenak y Rodríguez (2007) observaron anomalías en los espermatozoides <15 %; las más comunes fueron cabeza con forma de pera, seguida de acrosomas con perilla, gota citoplasmática proximal, colas simples y dobladas; estos hallazgos fueron detectados mediante contraste de fase microscopía de luz y SEM. Por otra parte, determinaron que la edad del semental bufalino tuvo un efecto significativo sobre la incidencia total de las anomalías formas de la cabeza, defectos de acrosoma, gotas citoplasmáticas proximales, y los defectos totales de la cola (tabla 5).

Tabla 5. Indicadores promedio del semen de búfalo colectado con vagina artificial

Parámetro	Características
Color	Blanco - lechoso
Volumen (ml)	3-5
Motilidad masal	3-4
Motilidad individual (%)	65-85
Vigor	$\geq 3$
Concentración (cel/ ml)	$600-1500 \times 10^6$
Espermatozoides vivos (%)	70 - 85
Acrosomas normales (%)	80-95
Anormalidades (%)	2 - 14
PH	6,5-7,2

Fuente: Adaptado de Vale (1994)

## Evaluación Del Semen Post-Descongelado

La evaluación del semen postdescongelado tiene como finalidad conocer si ese semen es capaz de superar el proceso de congelación-descongelación, donde la membrana de los espermatozoides se someten a una variedad de condiciones desfavorables entre las que destacan la deshidratación del espermatozoide, los cambios de la fase de transición de los fosfolípidos de la membrana, el efecto solución, la formación de hielo intracelular y la reducción del volumen de los canales de agua residual. Los valores del semen postdescongelado son descritos en la tabla 6.

Tabla 6. Indicadores de semen en fresco y semen postdescongelado

Parámetro	Semen en fresco	Semen postdescongelado	
		0 Hora	1 Hora
Motilidad individual (%)	60	40	30
Vigor (0-4)	3	2	2
Espermatoz vivos (%)	70	40	35
Anormalidades (%)	$\leq 15$	$\leq 30$	$\leq 35$

Fuente: Adaptado por autor de este artículo

Andrabi (2008) en su estudio sobre los factores que afectan la criopreservación de espermatozoides del butoro, concluyó que la viabilidad y fertilidad respecto a la congelación y descongelación de espermatozoides es más baja que en toros; durante el proceso de congelación-descongelación, las membranas de los espermatozoides se someten a una variedad de condiciones desfavorables entre las que destacan la deshidratación del espermatozoide, los cambios de la fase de la transición de los fosfolípidos de la membrana, el efecto solución, la formación de hielo intracelular y la reducción del volumen de los canales de agua residual. Sugiriendo así la necesidad de desarrollar extensores bioquímicamente definidos y procedimientos criogénicos que pueden resultar en mejoras en la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides congelados-descongelados.

En investigaciones realizadas (tabla 7), la tasa de fertilización en búfalos con IA no es comparable a la de ganado bovino. La tasa de concepción en las búfalas inseminadas en condiciones de campo es de aproximadamente 30 % (Kanchan y Singh 2005; Anzar et al., 2003). Algunos informes indican una tasa de preñes del 60 % con IA (Akhter, 2007). Sin embargo, una tasa de preñes con IA superior al 50 % se considera como un buen resultado (Vale, 1997). Es pertinente mencionar que las tasas de preñes con IA con cerca del 50 %, son considerados pobres en el ganado vacuno.

Tabla 7. Tasa de fertilidad en búfalas posterior a la Inseminación Artificial

Autores y Año	% fertilidad
Anzar et al. 2003; Kanchan y Singh, 2005;	
Pant et al. 2001	25-35
Presice et al 2004;	
Sosa et al; 2003;	
Sukhato et al. 2001;	
Taraphder et al. 2003	36-50
Akhter et al, 2007;	
Andrabi et al. 2006;	
Gokhale y Bhagat 2000;	
Prabhakar et al. 2002	51-60

Fuente: adaptado por autor de este artículo

### Pruebas Especiales De Evaluación Seminal

Se ha reportado altas correlaciones entre los resultados de diversas pruebas in vitro y la fertilidad. Entre las pruebas in vitro que han sido estrechamente relacionadas con la fertilidad están la prueba de penetración de moco cervical, las técnicas de evaluación de la reacción acrosómica, resistencia espermática a un medio hipotónico, prueba de penetración de ovocitos bovinos y bufalinos desprovistos de zona pelúcida, ensayo de

unión de espermatozoides a la zona pelúcida de ovocitos bovinos y bufalinos, penetración de ovocitos de hámster sin zona pelúcida, habilidad de realizar espontáneamente el proceso de capacitación espermática (Ramesha et al., 1993, Gamzu et al., 1994).

Sin embargo, los conocimientos aportados por los avances en la biología celular han permitido profundizar aún más en la fisiología de estos eventos reproductivos y están contribuyendo en la búsqueda de herramientas que permitan la implementación de nuevos métodos predictores de la fertilidad del hombre y los animales. En este sentido, se determinaron que la proteína P25b aislada de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos, se encuentra en mayor cantidad en los espermatozoides de toros con alta fertilidad en comparación con sub-fértiles, estableciendo que su determinación es de utilidad en la evaluación de la fertilidad potencial.

Del mismo modo, se han reportado que la presencia de proteínas específicas para la unión con heparina (HBP) en la superficie de la membrana espermática es un indicativo de la fertilidad potencial de los toros; todos estos conocimientos en las proteínas se están investigando en butoros, pero algunos resultados de estas investigaciones han sido controversiales, sugiriendo realizar mayor profundización en las diferentes razas bufalinas (Larson y Rodríguez 2000; Braundmeier y Miller 2001).

Existe una considerable variabilidad individual en la capacidad de los espermatozoides bufalinos para fecundar ovocitos in vitro, cuestión que ha sugerido la posibilidad de cuantificar esta habilidad a través de la capacitación espermática y la reacción acrosómica como un método estimador de la fertilidad en los programas de inseminación artificial (Ramakrishnan y Ariff, 1994).

### Interacción espermatozoide - ovocito

Numerosos métodos se han desarrollado a lo largo de los años para la evaluación de la calidad y fertilidad del semen (Larson y Rodríguez, 2000; Rodríguez, 2003; Aitken, 2006). Algunas de estas características medidas en los espermatozoides (Viabilidad, patrones de la motilidad, morfología, metabolismo de los espermatozoides, integridad de la membrana funcional e integridad acrosómica) entre ellos, la fertilidad del semen parece estar más estrechamente relacionada con la integridad de la membrana que con otras características generales (Larson y Rodríguez 2000). Por lo tanto, un método basado en la interacción espermatozoide y ovocito han sugerido (Gamzu, 1994)

Di Matteo (1997) utilizó la prueba de penetración de ovocitos bovinos desprovistos de zona pelúcida, con el fin de probar la capacidad de los espermatozoides del butoro para unirse al ovocito. Como los ovocitos

de búfalas son difíciles de obtener, debido al hecho de que las hembras de esta especie son sacrificadas sólo en la vejez o en la enfermedad, ellos preservaron ovocitos bovinos en solución salina, madurado *in vitro* y los utilizaron. Los resultados demostraron que para una evaluación rápida de los espermatozoides frescos o congelados, los ovocitos de bovinos se pueden utilizar, dando resultados similares a los ovocitos de búfala.

Los ovocitos de hámster pueden ser más convenientes a utilizar para pruebas funcionales (Ramesha et al., 1993), ya que permiten la entrada espermatozoides de muchos mamíferos incluyendo los espermatozoides de butoros, por lo tanto se puede utilizar para evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Barnabé et al., 1997).

Selvaraju et al., (2008) sugiere que ovocitos inmaduros en búfalos son penetrables por los espermatozoides y se puede utilizar para evaluar la calidad del semen y evaluar el grado de fertilidad del butoro. Este estudio indico que la integridad de funcional de la membrana, la subpoblación de espermatozoides positivos para

plasmalema, la estructura acrosomal y el potencial de membrana mitocondrial son las características más importantes que influyen en la fertilidad.

La determinación del potencial de membrana mitocondrial es útil para la caracterización del metabolismo celular, la apoptosis y la viabilidad de los espermatozoides (Marchetti et al., 2002). El potencial de membrana mitocondrial se encontró que tenía una buena correlación con la fertilidad *in vitro* en búfalos (Selvaraju et al., 2008). La literatura revela escasez de información acerca de la penetración de espermatozoides de butoros en ovocitos.

En conclusión, son bastante notorias las diferencias encontradas en la evaluación seminal de butoros, por tal motivo se deben seguir realizando estudios comparativos entre razas, edad del butoro, época y frecuencia de la colecta de semen, alimentación y tipo manejo; igualmente se hace necesario seguir desarrollando extensores bioquímicamente definidos y procedimientos criogénicos que pueden resultar en mejoras de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides.

## Referencias

- Aguar, P., Andrade, V., Abreu, J. Gomez, A., 1994. Physical and morphological semen characteristics of buffaloes aged from four to eight years old. Proc. 4th Int. Buffalo Congr., Sao Paulo, Brazil. 3: 486-488
- Aitken, R., 2006. Sperm function tests and fertility. Int J Androl. 29: 69-75
- Akhter, S., Ansari, MS., Andrabi, SMH., Ullah, N., Qayyum, M., 2007. Effect of antibiotics in extender on fertility of liquid buffalo bull semen. Pak Vet J. 27: 13-16.
- Almaguer, P., 2007. El búfalo una opción de la ganadería. Revista electrónica de Veterinaria VIII: 8.
- Álvarez, J., 2003. Manual de crianza del búfalo revista ACPA. Sistema reproductivo de la hembra. Sociedad Cubana de Criadores de Búfalos. 19-25.
- Andrabi, SMH., Siddique, M., Ullah, N., Khan, LA., 2006. Effect of reducing sperm numbers per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. Pak Vet J. 26: 17-19.
- Andrabi, S., 2008. Factors affecting the quality of cryopreserved Buffalo (Bubalus bubalis) Bull spermatozoa. Reprod Dom Ani. 10: 1023-1033
- Anzar, M., Ahmad M., Nazir, M., Ahmad, N., Shah, IH., 1993. Selection of buffalo bull: Sexual behaviour and its relationship to semen and fertility. Theriogenology. 40: 1187-1198.
- Barnabe, R., Barnabe, V., Ferrari, S., Zogno, M., Zuge, R., Baruselli, P., 1997. "In vitro" zona free hamster oocyte penetration test for evaluating the fertility of buffalo sperm. Proc. 5th World Buffalo Congr. Caserta, Italy. 1: 869-872.
- Barth, A., Tribulo, H., 2000. Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal: 16 al 19 de Agosto del 2000. 1 ed. Córdoba (Argentina). Universidad católica de Córdoba, 2000. 3-10, 55 p.
- Baruselli, P. 2006. Reproducción en búfalos. Facultad de Veterinaria U de Sao Paulo.
- Baruselli, P., Carvalho, T., 2006. Atualidades na reprodução de bubalinos. Memorias II simposio de bufalos Europa-America. Medellín - Colombia. 153-154
- Braundmeier, A.G., Miller, D.J., 2001. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. J Dairy Sci. 84: 1915-1925.
- Den Daas, N., 1992. Laboratory assessment of semen characteristics. Anim. Reprod. Sci. 28: 87-94.
- Di Matteo, L., 1997. Interazione eterologhe "in vitro tra spermatozoi de B. bubalis ed ovociti di bovino". PhD Thesis, University of Napoli Federico II., Napoli, Italy.
- Echeverry, J., 2003. Las Situaciones de Estrés en los Toros: Efectos en la Reproducción. El Cebú. 331: 52-57.
- Food and Agricultural Organization (FAO), 2006. FAOSTAT, Global Livestock Production and Health Atlas. Animal Production.
- Gamzu, R., Yogev, L., Amit, A., Lessing, J., Homonnai, Z.T., Yavez, H., 1994. The hemizona assay is a good prognostic value for the ability of sperm to fertilize oocytes *in vitro*. Fertil. Steril. 62(5): 1056-1059.
- Gokhale, SB., Bhagat, RL., 2000. Status of reproductive performance in rural buffaloes artificially inseminated using deep frozen semen. Indian J Anim Sci 70, 366-368.
- Hafez, E.S. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6. Ed. Interamericana McGraw - Hill. México D.F, 542 p.
- Hallap, T., Haard, M., Jaakma, U., Larsson, B. & Rodriguez-Martinez, H., 2004.

- Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology*. 62: 702-13.
- Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Håård, M.G., Håård, M.C., Johannisson, A. Rodriguez-Martinez, H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*. 52: 641-58.
- Javed, M. T., Khan, J.R., Kausar, P., 2000 Effect of age and season on some semen parameters of Nili- Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Vet. Arhiv*. 70: 83- 94.
- Kanchan, Singh, N., 2005. Semen characteristics, semen discard rate and fertility in Murrah buffalo bulls. *Indian J Anim Reprod*. 26: 120-122.
- Koonjaenak, S., Rodriguez-Martinez, M., 2007. Assessment of semen quality in Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. *Ital J Anim Sci*. 6(Suppl. 2): 701-704.
- Kumar, S., Sahni, K.L., Bistha, G.S., 1993. Cytomorphological characteristics of motile and static semen of buffalo bulls. *Buffalo J*. 2: 117-127.
- Kumar, S., Sahni, K.L., Benjamin, B.N., Mohan, G., 1993. Effect of various levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters without adding glycerol. *Buffalo J*. 1: 79-85.
- Larson, B., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility. *Anim Reprod Sci*. 60-61: 327-336.
- Lohachit, C., 1987. Anatomy and clinical examination on female reproductive org of swamp buffalo reproduction. Ed Thailand. 93-1001.
- Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., Marchetti, P., 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reprod*. 17: 1257-1265.
- Nazir, M., 1988. Semen evaluation and sperm morphology. Monograph on Reproductive Pattern of Riverine Buffaloes and Recommendations to Improve Their Reproductive Performance at Small Farmer Level. Pakistan Agri. Res. Council, Islamabad, Pakistan.
- Nordin, W., Hilmi, M., Bongso, T. A., 1990. Semen characteristics related to age in growing swamp buffalo (*Bubalus babalis*). *Buffalo J*. 2: 161-6.
- Palacios, C., 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. Memorias posgrado de reproducción bovina. CGR Colombia.
- Pant, H.C., Barot, L.R., Kasiraj, R., Misra, A.K., Prabhakar, J.H., 2001. Effect of clitoral stimulation after artificial insemination on conception rate in the buffalo. *Bubalus Bubalis*. 7: 66-69.
- Pant, H. C., Sharma, R. K., Patel, S. H., Shukla, H. R., Mittal, A. K., Kasiraj,R., Misra, A. K., Prabhakar, J. H., 2003. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. *Theriogenology*. 60: 27-34.
- Prabhakar, JH., Kalsi, JS., Jani, VR., Patel, SH., 2002. Effect of live sperm count per inseminate on pregnancy rate in buffaloes. *Indian J Anim Reprod*. 23: 170-172.
- Presicce, GA., Verberckmoes S, Senatore EM, Pascale M, Dewulf JJ, Soom AV, 2004: Assessment of a new uterotubal junction insemination device in the Mediterranean Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) under field conditions. *Bubalus Bubalis*. 10: 58-64.
- Ramakrishnan, P., Ariff, M., 1994. Effect of glycerol level and cooling rate on post-thaw semen quality of Malaysian swamp buffalo. *Proc. 4th Int. Buffalo Congr., Sao Paulo, Brazil*. 3: 540-542.
- Ramesha, K., Goswami, S., Das, S., 1993. Zona-free hamster oocyte penetration test for assessing fertility of Murrah buffalo *Bubalus bubalis* bull. *Buffalo J*. 3: 259-263.
- Rattan, P.J.S., 1990. Physico-chemical constituents of buffalo bull semen. In: Acharya, R.M. Lokeshwar, R.R., Kumar, S. Eds. *Recent Advances in Buffalo Research*. 3: 26-30.
- Rodriguez-Martinez, H., 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reprod Dom Anim*. 38: 312-318.
- Saeed, A., Chaudhry, R., Khan, I.H., Khan, N.U., 1990. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya, R.M. *Recent Advances in Buffalo Research*. 3: 17-19.
- Sajjad, S. Akhter., Andrabi H., 2007. Blood Serum Testosterone Level and its Relationship With Scrotal Circumference and Semen Characteristics in Nili-Ravi Buffalo Bulls. *Pakistan Vet. J*. 27(2): 63-66
- Sansone, G. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci*. 62 : 55-76.
- Selvaraju, S., Ravindra, JP., Ghosh J., Gupta, P.S., Suresh. KP., 2008. Evaluation of sperm functional attributes in relation to in vitro sperm zona pellucida binding ability. *Anim Reprod Sci*. 106(3-4): 311-321.
- Sosa, GA., El-Deeb. ED., El-Sabagh, KM., 2003. Interactions of diluents, cryoprotective agents and straw filling capacity on quality and fertilizing ability of buffalo semen. *Vet Med J Giza*. 51: 553-566.
- Spitzer, J.C. 2000. Bull breeding soundness evaluation: Current status. In: *Topics in Bull Fertility*, P.J. Chenoweth, ed. International Veterinary Information System. Ithaca, N.Y.
- Sukhato, P., Thongsodseang, S., Utha, A., Songsasen, N., 2001. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 67: 69-77.
- Suryaprakasam, T, B., Rao, A.V., 1993. Studies on seminal characteristics of multiple breed AI bulls. *Indian Vet J*. 70: 629-632.
- Talevi, R., Pelosi, S., Sansone, G., Grasso, F., Matassino, D., 1994. Effects of different pre-freezing rates on buffalo sperm. Motility and ultrastructure preservation. *Proc. 4th Int. Buffalo Congr., Sao Paulo, Brazil*. 3: 537-539.
- Taraphder, S., Gupta, AK., Raina, VS., Tomar, SS., 2003. Studies on fertility performance of Murrah buffalo bulls. *Indian J Anim Health*. 42: 182-184.
- Vale, W., 1994. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen of buffalo semen. *Buffalo J*. 2: 65-72.
- Vale, W., 1997. News on reproductive biotechnology in males. *Proc. 5th World Buffalo Congr., Caserta, Italy*. 1: 103-123.
- Vale, W., 2006. Evaluación andrológica del semental bufalino. Memorias II simposio de búfalos Europa-América. Medellín – Colombia. 163-164.
- Younis, M., 1996. Studies on semen quality, freezability and fertility of buffalo bulls during low and peak breeding seasons. PhD Thesis, Univ. Agri. Faisalabad, Pakistan.