

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE CINÉTICA ESPERMÁTICA,
OBTENIDOS POR SISTEMA DE EVALUACIÓN SEMINAL ASISTIDO POR
COMPUTADORA (CASA), Y FERTILIDAD IN VIVO EN PROTOCOLOS DE
IATF CON SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO**

por

Lucía ASTORE y Fabrizio Aarón SARRAUTE

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD ENSAYO EXPERIMENTAL

MONTEVIDEO

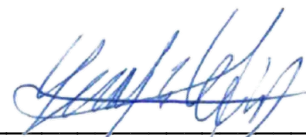
URUGUAY

2024

1. APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Serafín Ceriani

Segundo miembro (Tutor):



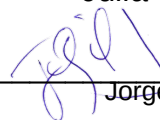
María Victoria Pons

Tercer miembro:



Julia Giriboni

Cuarto miembro:



Jorge Gil

Quinto miembro:



Eduardo Blanc

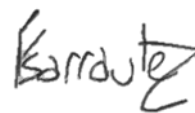
Fecha:

13/12/2024

Autores:



Lucia Astore



Fabrizio Sarraute

2. AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias y amigos, por el apoyo incondicional en estos años de estudio.

A nuestros tutores y co-tutores, Victoria, Jorge “Jujo” y Eduardo, por tenernos en cuenta para realizar esta investigación, apoyarnos y acompañarnos durante la misma y compartir información y experiencias tan valiosas para nosotros.

Al equipo veterinario del establecimiento, quienes realizaron el trabajo de campo y nos recibieron de la mejor manera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. APROBACIÓN.....	2
2. AGRADECIMIENTOS.....	3
3. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
4. RESUMEN.....	7
5. SUMMARY.....	7
6. INTRODUCCIÓN.....	8
7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
7.1. La producción bovina nacional.....	9
7.2. Tecnologías disponibles para aumentar la eficiencia de la cría.....	11
Inseminación artificial en vacas de cría.....	11
Inseminación artificial a tiempo fijo.....	12
Hormonas y protocolos utilizados en programas de IATF	14
Factores que influyen en los resultados de las IATF.....	15
Factores inherentes al animal.....	15
Factores de manejo.....	16
Factores climáticos.....	17
Semen.....	17
7.3. Evaluación e importancia de la calidad seminal	17
Evaluación seminal in vivo.....	19
Evaluación seminal in-vitro.....	20
Espermograma.....	20
Motilidad individual.....	21
Morfología espermática.....	22
Concentración espermática.....	24
Pruebas de funcionalidad espermática.....	24
Pruebas para evaluar la integridad de la cromatina.....	25
Test de interacción entre gametos.....	26
Análisis automatizados de espermatozoides.....	27
Citometría de flujo.....	27
Análisis de esperma asistido por computadora (CASA)..	27
7.4. Características de los sistemas computarizados CASA.....	28
Principales evaluaciones de los sistemas CASA.....	29
Motilidad/Cinética.....	29
Morfología/Morfometría.....	32
Concentración.....	33
Fragmentación del ADN.....	34
Actividad mitocondrial e integridad de acrosomas, membranas y ADN	34
Análisis de subpoblaciones.....	34
8. HIPÓTESIS.....	36

9. OBJETIVOS.....	36
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
11. RESULTADOS.....	40
12. DISCUSIÓN.....	44
13. CONCLUSION.....	49
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

3. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Porcentajes de preñez a nivel nacional de los años 2003 a 2023 y el promedio de los mismos.....	10
Figura 2. Porcentajes de destete a nivel nacional, en un rango de 18 años (2003-2020) y el promedio de los mismos.....	10
Figura 3. Representación esquemática del movimiento de un espermatozoide, mostrando parámetros cinéticos.....	30
Figura 4. Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide.....	33
Figura 5. Protocolos utilizados en las vacas a lo largo del experimento.....	38
Tabla 1. Representación de media, mediana y desvío estándar de los resultados de preñez, variables de cinética espermática del CASA y variables calculadas en base a estos.....	41
Tabla 2. Resultados del análisis de correlación entre preñez general, preñez con GnRH y preñez de vacas que demostraron celo, y las diferentes variables seminales evaluadas mediante el sistema CASA.....	42
Tabla 3. Comparación entre parámetros de cinética espermática y resultados de preñez bajos (< 64,9 %) y altos (≥ 64,9 %) en los protocolos de IATF.....	44

4. RESUMEN

Los sistemas agropecuarios que se dedican a la cría de ganado vacuno son los determinantes del volumen y calidad de la producción cárnica del futuro de nuestro país. La eficiencia de estos sistemas es determinada por diversos factores, uno de los más importantes es la eficiencia reproductiva alcanzada. Para la mejora de la eficiencia reproductiva existen biotecnologías de la reproducción con resultados comprobados, como es el caso de la IATF. Esta herramienta, cuando se aplica correctamente, trae consigo diversos beneficios productivos que ya han sido ampliamente estudiados. Los resultados de preñez alcanzados mediante esta técnica, son determinados por diversos factores, uno de ellos es el semen utilizado. Las técnicas de evaluación seminal son variadas, en los últimos años la utilización del espermiograma viene siendo acompañada por el uso de sistemas de evaluación seminal asistido por computadora (CASA), lo cual tiene la ventaja de brindar resultados más objetivos y repetibles en comparación con el análisis tradicional. El sistema CASA calcula diversos parámetros que clasifican y determinan la calidad del movimiento espermático, fundamental a la hora de la fertilización. En esta investigación, mediante el procesamiento de datos de más de 8000 inseminaciones realizadas con 39 partidas de semen (analizadas mediante este sistema), se correlacionaron algunos parámetros de cinética espermática con la fertilidad alcanzada en protocolos de IATF a campo. Los parámetros que demostraron estar correlacionados significativamente con la fertilidad, en nuestra investigación, fueron CONC, NTE, BCF, STR y HAC. Estos parámetros tienen el potencial de ser usados como una herramienta capaz de predecir la fertilidad de una muestra de semen según sus características de cinética.

5. SUMMARY

The agricultural systems dedicated to cattle breeding are key determinants of the volume and quality of future meat production in our country. The efficiency of these systems is influenced by various factors, one of the most important being the reproductive efficiency achieved. To improve reproductive efficiency, there are biotechnologies with proven results, such as Fixed-Time Artificial Insemination (IATF). When applied correctly, this tool brings various productive benefits that have been extensively studied. The pregnancy rates achieved through this technique are determined by several factors, one of which is the semen used. Semen evaluation techniques are varied; in recent years, the use of sperm analysis (spermiogram) has been complemented by computer-assisted sperm analysis (CASA), which provides more objective and repeatable results compared to traditional analysis. The CASA system calculates various parameters that classify and determine the quality of sperm motility, which is essential for fertilization. In this research, by processing data from over 8,000 inseminations using 39 batches of semen (analyzed through this system), we

correlated some parameters of sperm kinetics with the fertility achieved in field IATF protocols. The parameters that showed significant correlation with fertility in our study were CONC, NTE, BCF, STR, and HAC. These parameters have the potential to be used as a tool to predict the fertility of a semen sample based on its kinetics characteristics.

6. INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos en los protocolos de IATF dependen de varias variables que siempre deben ser tenidas en cuenta si se desea obtener el mejor resultado posible, una de ellas es la calidad del semen a utilizar (Butler, 2008). Las IATF requieren de una mejor calidad seminal (Bó et al., 2007), ya que los animales son sincronizados e inseminados en su totalidad con un margen horario limitado, sin tener en cuenta la variabilidad que pueda existir en la respuesta al estímulo hormonal (Bó et al., 2023), es por esto que sería un gran beneficio lograr que un análisis seminal in vitro lograra predecir la fertilidad in vivo (Ward et al., 2001).

Los métodos tradicionales de evaluación del semen, en su mayoría tienen un gran componente subjetivo, haciendo que los resultados dependan del operador. Debido a esto, suelen ser muy variables, poco repetibles y difícilmente capaces de predecir fertilidad (Valverde, 2021). Es por esto que surgen herramientas como los sistemas de análisis seminal asistidos por computadoras (CASA), los cuales son capaces capturar el movimiento celular, reconstruyendo las trayectorias de los espermatozoides y la posición de estos en animaciones sucesivas, calculando varios parámetros de movilidad y concentración de manera objetiva (Valverde, 2021).

Los parámetros cinéticos que brinda el CASA, se han intentado correlacionar en repetidas ocasiones con la fertilidad in vitro e in vivo (den Daas, 1992; Kathiravan, Kalatharan, Edwin y Veerapandian, 2008). Aunque los resultados son contradictorios entre los autores, algunos tales como den Daas (1992), Christensen et al. (1999) y Broekhuijse et al. (2012) afirman que estos sistemas permiten predicciones más precisas de la fertilidad esperada en comparación con el análisis de la misma mediante espermiograma tradicional. Varios autores han logrado establecer correlaciones significativas entre los parámetros cinéticos que brinda el CASA y la tasa de fertilidad lograda (Farrell Presicce, Brockett y Foote, 1998; Nagy, Polichronopulus, Gáspárdy, Solti y Cseh, 2015), sin embargo, existe cierta controversia a la hora de establecer cuáles son los parámetros que realmente son capaces de predecir la fertilidad.

En esta tesis se intentó establecer, mediante la recopilación de información correspondiente a 6 años y 8179 vacas inseminadas con 39 partidas de semen analizadas por el sistema CASA, si existe o no una correlación entre los parámetros cinéticos brindados por este método de análisis y la fertilidad obtenida en programas de IATF a campo.

7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

7.1 La producción bovina nacional

Uruguay cuenta con un área productiva total de 16 millones de hectáreas. De estas, 15 millones son utilizadas para la bovinocultura. Los productores que agrupa esta actividad en nuestro país son alrededor de 52.000, esto incluye explotaciones lecheras, agrícola-ganaderas y ganaderas (DIEA, 2021; MGAP, 2020).

Según las declaraciones juradas del año agrícola 2019-2020, las que contienen ganadería (ganadero y agrícola ganadero) suman un total de 48.423 productores. Dentro de estos, unos 30.000 (63%) se dedican al proceso de la cría y a la vez ocupan unos 10 millones de hectáreas (70% de la superficie productiva de Uruguay) (DIEA, 2021). El total de bovinos en Uruguay es de 11,57 millones de cabezas. De este total, 4,23 millones son vacas de cría entoradas, de las cuales se producen alrededor de 2,8 millones de terneros (MGAP 2021).

El proceso de la cría es fundamental para nuestro país, ya que es uno de los principales eslabones de la cadena cárnica, por lo que sus buenos o malos resultados influyen directamente en el número de animales que llegan a faena y también en su calidad. A nivel nacional, la cría presenta una eficiencia baja en comparación a otros procesos como el engorde o la lechería. Sin embargo, logra cubrir sus requerimientos con recursos de menor calidad como el campo natural, pudiendo desarrollarse en zonas de menor aptitud pastoril (Rovira, 1996).

Históricamente, el porcentaje de preñez y el porcentaje de destete, son indicadores utilizados para describir la eficiencia reproductiva global de los sistemas de cría. El porcentaje de preñez se obtiene al dividir el número de vacas que resultan preñadas, entre el número de vacas que fueron ingresadas a servicio, multiplicado por 100 para expresarlo en porcentaje. En la figura 1 se ilustra mediante un gráfico los porcentajes de preñez a nivel nacional en un rango de 21 años (2003 -2023). El general obtenido es de 74.46%.

Las variaciones observadas anualmente promedio en el porcentaje de preñez de nuestro país, se deben principalmente a las condiciones meteorológicas propias de cada año, ya que la cría se desarrolla en condiciones extensivas, y el clima es uno de los principales factores que determinan la cantidad de pasto disponible para los animales.

Tomando el promedio nacional de 74% de preñez a través de los años, vemos que hay alrededor de un 25% de vacas que año a año resultan vacías. Se ha identificado que la mayor problemática de la fertilidad del rodeo radica en el prolongado anestro post parto que enfrentan las vacas (Bonavera, Schiersmann, Alberio y Mestre, 1990; Dunn y Kaltenbach, 1980; Entwistle, 1983; Geymonat, 1985; Pimentel et al., 1979; Rovira, 1973). La duración de dicho anestro, se

explica principalmente por el efecto del amamantamiento y la nutrición (Randel,1990; Short et al., 1990; Williams, 1990).

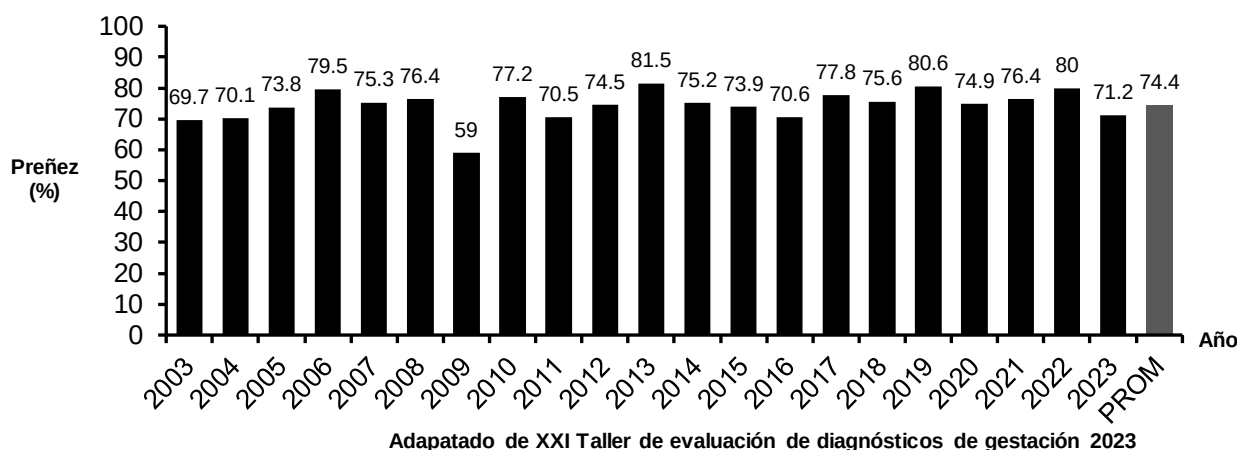


Figura 1: Porcentajes de preñez a nivel nacional de los años 2003 a 2023 y el promedio de los mismos.

El porcentaje de destete se obtiene al dividir el número total de terneros obtenidos, sobre las vacas servidas, multiplicado por 100 para expresarlo en porcentaje. En la figura 2 se ilustra mediante un gráfico los porcentajes de destete obtenidos a nivel nacional en un margen de 18 años (2003-2020). El promedio para este período es de 65%.

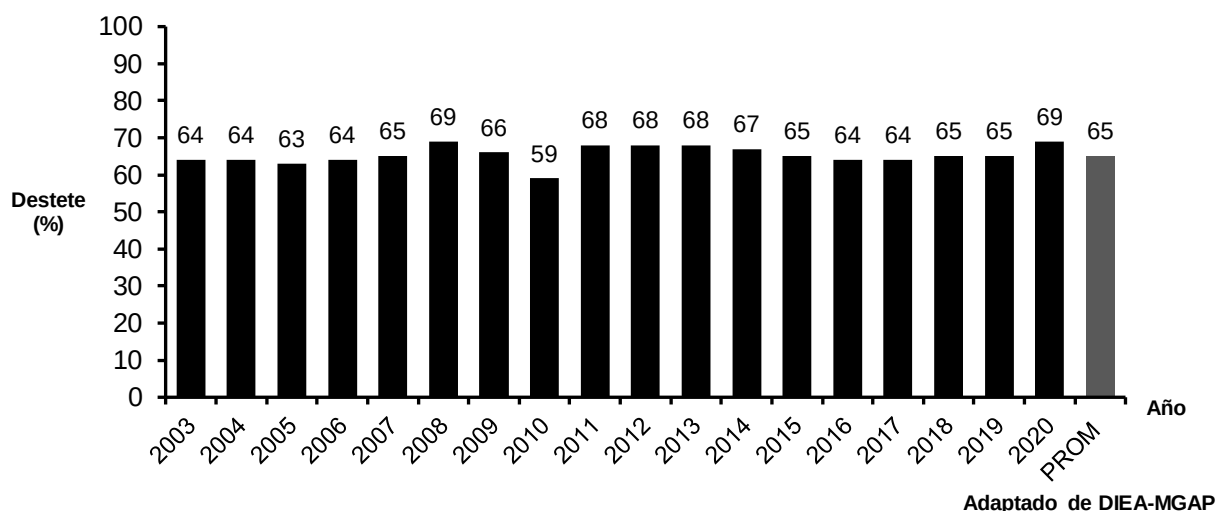


Figura 2: Porcentajes de destete a nivel nacional, en un rango de 18 años (2003-2020) y el promedio de los mismos.

Como vemos al comparar las dos gráficas anteriores, anualmente existe una diferencia porcentual entre el porcentaje de preñez y el porcentaje de destete obtenido. Esto se debe a que las pérdidas embrionarias tardías y la mortalidad neonatal de terneros suman aproximadamente 10% (Mederos, Faliveni y Dutra., 2022).

Ambos indicadores expuestos anteriormente presentan valores mejorables, y sus resultados explican por qué la eficiencia del proceso de la cría en nuestro país se describe como baja. La eficiencia reproductiva es el primer eslabón en la cadena de producción, y es quien determina en gran medida la eficiencia global de todo el proceso (Antognazza, Cresci y Ferreira, 2007). La cantidad de terneros que se obtienen, el peso al destete de los mismos y el valor del kilogramo del ternero vendido, son los tres principales determinantes de la ecuación de ingresos de cualquier rodeo de cría. La eficiencia reproductiva del rodeo influye, por un lado, determinando el número de terneros logrados y por otro, afectando el peso al destete de los mismos. Las preñeces tempranas se traducen en pariciones tempranas y en más kilos de terneros destetados a una fecha fija (Marcantonio, 2003).

7.2 Tecnologías disponibles para aumentar la eficiencia de la cría

Las tecnologías disponibles para aumentar la eficiencia de la cría son diversas, entre ellas: destete temporario, destete precoz, ajuste de carga, monitoreo de condición corporal, examen de aptitud reproductiva de toros, vacunación y control de enfermedades de la reproducción, uso de hormonas como tratamiento para el anestro mediante inseminación artificial a tiempo fijo, sincronización de celos, modificaciones de la época y duración del entore, diagnóstico de actividad ovárica y diagnóstico de preñez (de Nava, 2011).

Inseminación artificial en vacas de cría

Se puede definir a la inseminación artificial (IA) como una técnica mediante la cual se deposita en el tracto reproductivo de la hembra, mediante la intervención del hombre y el instrumental adecuado, semen previamente extraído, analizado y procesado. El objetivo de la inseminación artificial es depositar un número determinado de espermatozoides vivos en el tracto genital femenino, en el momento adecuado, que permita la fecundación del óvulo (Cavestany y Méndez, 1993).

La IA es una de las herramientas más importantes para el mejoramiento genético, ya que mediante unos pocos reproductores se pueden generar suficientes dosis para poder inseminar miles de hembras al año. La mejora genética resultante, es en efecto más económica que el tener que adquirir toros con el valor genético necesario para lograr los cambios deseados (Cavestany y Méndez, 1993). Otro beneficio importante, es que esta tecnología ayuda a mejorar los registros reproductivos, y de esta manera detectar vacas que no se preñan o que no ciclan normalmente; además, permite programar la fecha de los partos (Díaz, 2021).

La eliminación o reducción de los toros en el establecimiento es otro de los beneficios existentes del uso de la IA. Además, se mejora el control sanitario del rodeo mediante la utilización de semen certificado como libre de enfermedades

venéreas, y también se logra un mayor conocimiento del rodeo al poder tener registros del padre de cada ternero (Cavestany y Méndez, 1993). Marizancén y Artunduaga (2017), agregan que para el caso del ganado de carne, la IA permite hacer cruzamientos dirigidos y precisos con el objetivo de lograr terneros capaces de tener mayores tasas de crecimiento y masas musculares, haciendo que se obtenga un producto atractivo para el mercado y se mejore la rentabilidad.

La mayor desventaja de IA es que, así como efectuada correctamente logra progresos genéticos y mejora la productividad en cortos períodos de tiempo, hay que tener en cuenta que también existen ciertos riesgos que pueden afectar al sistema con facilidad y rapidez. La mala elección de reproductores (no permitiendo el avance genético), técnicas de inseminación deficientes o utilización de dosis de semen no aptas y/o que no cumplan con los requisitos sanitarios indispensables son riesgos asociados a la implementación de esta tecnología (Cavestany y Méndez, 1993).

También se reporta una disminución de la fertilidad en la IA en comparación con la monta natural, debido a que en esta última el semen depositado en la vagina de la vaca contiene una cantidad de espermatozoides muchísimo más alta que la utilizada en IA y además no pasa por las manos del hombre (factor que lo expone a una cantidad de elementos que pueden afectar su calidad). La disminución de la fertilidad reportada en la IA, también se relaciona con la dificultad de la detección de celos presente en la IA. Los toros son capaces de detectar un mayor número de vacas en celo que cualquier observador. Además, algunas vacas pueden tener una menor intensidad en la demostración visual del celo (hasta un 27% de las mismas), por lo que son difíciles de detectar visualmente por parte del hombre (Cavestany y Méndez, 1993).

Inseminación artificial a tiempo fijo

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una tecnología que, mediante la aplicación secuencial de determinadas hormonas, sincroniza la ovulación permitiendo la inseminación sistemática de hembras en un corto período de tiempo sin necesidad de detectar celo (de Nava, 2015). Mediante la IATF es posible superar las principales limitantes que históricamente habían representado un obstáculo para la adopción de la IA en vacas de cría: el anestro posparto, la detección de celo y la pubertad tardía (Bó, Cutaia y Veneranda 2003; Menchaca et al., 2013). La adopción de esta tecnología en países de Sudamérica, Norteamérica y Oceanía comenzó a crecer de manera significativa a partir de los años 2000, transformándose probablemente en la biotecnología de la reproducción que ha mostrado mayor crecimiento en los últimos años. En la actualidad esta herramienta es utilizada en diferentes condiciones a través de

un importante número de profesionales que la aplican sin mayores inconvenientes y con resultados aceptables (Menchaca et al., 2013).

Dentro de los beneficios más importantes que tiene la IATF, es que permite inseminar vaquillonas y vacas con cría tanto ciclando como en anestro (superficial o profundo), aunque con resultados variables. Otro beneficio reportado es el incremento de la tasa de preñez final del rodeo, explicado, entre otras cosas, por el estímulo hormonal que logra promover el retorno a la ciclicidad de las vacas en anestro, donde por más que no resulten preñadas en esa primera IATF, es más probable que lo consigan en los siguientes servicios dentro del período de servicios. Además, la manipulación hormonal del ciclo estral, con la consiguiente sincronización de la ovulación, logra evitar la detección de celos, reducir la temporada de inseminación y simplificar el trabajo con el rodeo si lo comparamos con una inseminación tradicional (Menchaca et al., 2013).

Los terneros producidos por IATF son más pesados al destete, esto se debe a que en el primer día de servicio se podrían obtener alrededor del 50% de los vientres preñados y esto aumenta significativamente la cabeza de parición del año siguiente, redundando en terneros de mayor edad y por tanto mayor peso al momento del destete. Además, el peso de los terneros es mayor debido al progreso genético logrado por la utilización de toros genéticamente superiores (Bardier, 2020). Cuitaia et al. (2005) comprobaron lo anteriormente mencionado, al comparar el peso al destete de terneros obtenidos por monta natural con el de terneros obtenidos mediante IATF. Los terneros hijos de IATF fueron 19.5 kg (machos) y 21.3 kg (hembras) más pesados que los hijos de monta natural. Esto también fue evaluado por De Nava (2013), quien obtuvo terneros 11% más pesados mediante IATF en comparación con terneros de monta natural (161,5 kg vs 143,1 kg respectivamente). El efecto de aumento del peso de los terneros al destete tiene gran importancia económica para predios criadores, ya que, a la hora de vender los terneros, estos son más pesados y más homogéneos, lo que facilita su comercialización (Bardier, 2020).

Lograr preñeces tempranas también repercute positivamente en las madres, ya que permite un mayor tiempo de recuperación de la fisiología reproductiva y el reinicio de la ciclicidad ovárica de la vaca previo al comienzo de la temporada de servicios, repercutiendo de manera directa en una mejora del porcentaje y de la calidad de las preñeces obtenidas al siguiente año (Menchaca et al., 2013).

Para que las ventajas de la IATF puedan ser debidamente capitalizadas, es necesario que la instrumentación de esta tecnología se haga con racionalidad. En cualquier caso, la IATF no debería utilizarse como práctica para corregir malos manejos reproductivos de los rodeos. En realidad, los mayores beneficios de la aplicación de la IATF se dan en rodeos bien manejados, cuando se la emplea el primer día de la estación reproductiva y cuando se la integra

racionalmente a otras tecnologías en un manejo reproductivo controlado que busque lograr una buena transformación de pasto en terneros (de Nava, 2015).

Hormonas y protocolos utilizados en programas de IATF

Para implementar la IATF en las condiciones productivas de Uruguay se debe superar, como fue mencionado anteriormente, el anestro en las vacas luego del parto y muchas veces también en las vaquillonas. Frente a esta situación los tratamientos más eficaces son aquellos diseñados específicamente para inducir la ovulación. Mediante esta tecnología se logran obtener resultados aceptables tanto para vacas que se encuentren ciclando, en anestro superficial, como también en vacas en anestro profundo que contengan folículos menores a 8 mm, pero con una condición corporal ≥ 3 puntos (en una escala de 1 a 8, Menchaca et al., 2013).

El conocimiento de la fisiología ovárica es fundamental para el desarrollo de tratamientos que permitan la manipulación de la función ovárica. Es por esto, que los diferentes protocolos de inducción de la ovulación involucran la utilización de diferentes hormonas, como lo son la Prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), Progesterona (P4), Estradiol (E2), Gonadotropina coriónica equina (eCG) y Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Bó et al, 2023).

Los protocolos de IATF en base a estradiol y progesterona están ampliamente validados y han sido utilizados por más de 20 años en diferentes condiciones en todos los países de Latinoamérica (Bó, 2020). Estos protocolos en general logran un 50 a 60% de preñez en promedio con resultados consistentes en diferentes condiciones de trabajo (Menchaca et al., 2013; Bó et al., 2018). Sin embargo, la UE no permite el uso de estos fármacos en sus países y ejerce presión sobre aquellos países que abastecen este mercado de alimentos derivados de animales para que también restrinjan su uso. Como consecuencia, en diciembre de 2020 Uruguay suspendió la importación, elaboración para uso interno, comercialización y tenencia de productos que contengan 17 β -estradiol y sus derivados tipo esteres (Resolución DGSG N 269/020 y N 263/021, Dirección General de Servicios Ganaderos, 2020, 2021).

En aquellos países donde se ha desarrollado la tecnología de la IATF y las sales de estradiol no están disponibles, los protocolos han utilizado otras alternativas. El protocolo más emblemático es el Ovsynch por ser el primer tratamiento para IATF desarrollado en EEUU, este únicamente utiliza GnRH y PGF₂ α (Pursley et al., 1995). Sin embargo, este protocolo no es tan eficaz en vacas en anestro en comparación con otros protocolos que incluyen el uso de sales de estradiol y progesterona, por lo que fueron desarrolladas diferentes alternativas. Entre estas, las más importantes fueron la inclusión de dispositivos de P4 y GnRH (Co-

synch 7/5 días) (Geary y Whittier, 1998; Bridges et al., 2008; 2014; Whittier et al., 2013; Day, 2015; García Pintos et al., 2022).

Factores que influyen en los resultados de las IATF

Los factores involucrados en el éxito de los programas de IATF, fueron clasificados y desarrollados por Butler (2008) como: factores inherentes al animal, factores de manejo, factores climáticos y otros factores.

Factores inherentes al animal

Edad (púber o prepuberal): Cuando nos enfrentamos a animales pre puberales, tenemos que tener en cuenta que estos se encuentran en anestro. La respuesta a los tratamientos hormonales y la fertilidad de las ovulaciones inducidas dependen de la profundidad del mismo (Butler, 2008).

Raza (Bos indicus o Bos taurus): Las diferencias existentes entre algunas razas ha generado que se planteen tratamientos diferenciales, intentando alcanzar resultados similares (Randel, 1986). Un ejemplo de esto es la susceptibilidad al estrés de las razas índicas. Su temperamento determina que frente a manipulaciones intensivas el estrés generado afecte los resultados (Butler, 2008).

Números de Partos (primípara o múltipara): El número de partos del animal influye en los resultados obtenidos. Existen diferencias importantes entre vacas primíparas y múltiparas. Las primíparas suelen tener anestros post parto más prolongados y más profundos debido a mayores requerimientos. Esto se intensifica en vaquillonas servidas a los 15 meses (Butler, 2008).

Nutrición y condición corporal: Desde hace varias décadas se conoce que la nutrición se relaciona de manera directa con los eventos reproductivos (Dunn, Ingalls, Zimmerman y Wiltbank, 1969; Lamond, 1970; Wiltbank et al. 1962 y 1964). La cantidad y calidad del alimento disponible influyen directamente en la condición corporal y el anestro post parto. Variables del ciclo estral tales como su duración, ondas foliculares, tamaño de las estructuras presentes en los ovarios y la concentración circulante de las principales hormonas involucradas, se ven modificadas frente a una nutrición insuficiente (Santori, 2009); es por esto que la duración y la profundidad del anestro post parto se prolonga en vacas con una baja condición corporal (Butler, 2008), y explica porque en la medida que la condición corporal se hace más crítica, la fertilidad a la IATF cae dramáticamente (Cutaia, Veneranda, Tríbulo, Baruselli y Bó, 2003).

La nutrición influye sobre el sistema endócrino de los seres vivos, esto ha sido ampliamente estudiado desde la década del '80 (Whisnant, Kiser, Thompson y Hall, 1985). Gracias a esto, hoy en día se conocen los factores endocrinos que interactúan durante el anestro post parto según la condición corporal de las vacas (Flores et al., 2008). La nutrición también tiene su efecto sobre el inicio de

la pubertad, donde se ha demostrado que la tasa de desarrollo durante la etapa del predestete está inversamente correlacionada con la edad a la pubertad en vaquillonas para carne (Schillo, Hall y Hileman, 1992).

Algunos oligoelementos también juegan un rol fundamental en la reproducción, estos también deberían ser considerados, especialmente en regiones donde se conoce que los mismos suelen ser deficitarios (Paterson y Engle, 2005).

Factores de manejo

Personal: La cantidad e idoneidad del personal es determinante para realizar cómodamente y en las mejores condiciones cada una de las etapas necesarias para realizar una IATF. El veterinario a cargo debe evaluar cada establecimiento y lote de animales en particular, para determinar el protocolo a utilizar. Todos los pasos deberían ser realizados por él mismo (colocación y extracción de dispositivos y aplicación de hormonas, Butler, 2008).

Instalaciones, manga y corrales: Las instalaciones disponibles son muy importantes a la hora de aplicar esta tecnología. Por un lado, debemos asegurar la seguridad del inseminador y operarios, y por otro debemos de tener las condiciones como para trabajar de manera tranquila sin mayores sobresaltos que luego puedan repercutir en los resultados finales. La presencia de techos y reparos son fundamentales, sobre todo para asegurar una correcta protección del proceso de descongelación de semen. Es conocido que el semen es muy sensible a los cambios de temperatura, al sol y al agua, entre otras (Butler, 2008).

Número y tipo de animales a tratar: La cantidad de personal necesario debe adecuarse al número y tipo de animales, así como también a las instalaciones con las que se cuenta (Butler, 2008).

Estrés: Es bien sabido que el estrés repercute negativamente en la fertilidad. Este actúa a nivel de los centros superiores del SNC, más específicamente sobre el hipotálamo, reduciendo tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH. Es por esto que es fundamental la identificación y control de los factores estresantes (Dobson y Smith, 2000). Generalmente cualquier manipulación del animal desencadena una respuesta de estrés, nuestro objetivo debe ser que el nivel de estrés que generemos al aplicar esta tecnología sea el menor posible, garantizando que su efecto no repercuta en una disminución de la fertilidad potencial (Dobson, Tebble, Smith y Ward, 2001).

Es común que en el medio rural nos encontremos trabajando de manera conjunta con perros de arreo. La sola presencia de los perros ya fue comprobada como factor estresante, por lo que debemos intentar que los mismos no estén presentes en estos manejos. Algo similar ocurre con el uso de picanas eléctricas u otro tipo de instrumentos (Butler, 2008).

Manejo de los animales en las diferentes etapas del trabajo: Los tratamientos sanitarios deben ser preferentemente evitados hasta al menos 35 días después de realizada la IATF, ya que los mismos pueden interferir en los resultados (Butler, 2008).

Factores climáticos

En el invierno, las pocas horas de luz del día limitan el número de animales que se pueden inseminar (Butler, 2008). Por otro lado, en el verano, las altas temperaturas son un factor determinante en la fertilidad alcanzada. Es sabido que el estrés calórico disminuye la fertilidad. El aumento de la temperatura corporal repercute sobre la manifestación del celo y la funcionalidad ovárica, afectando la viabilidad del ovocito y por tanto su posterior desarrollo (Dunn et al., 1969; Wolfenson, Roth y Meidan, 2000). La recomendación para este último caso es programar las inseminaciones para los momentos más frescos del día, y evitar hacerlas a aquellas horas donde las temperaturas son máximas (Butler, 2008).

Semen

La calidad seminal tiene especial importancia en los protocolos de IATF, esto fue confirmado tanto en rodeos lecheros (De Jarnette, 2004) como de carne (Bó et al., 2005). Al aplicar esta tecnología, es frecuente que, en un mismo lote homogéneo de animales, se obtengan resultados diferentes de fertilidad dependiendo del reproductor utilizado. También ocurre que un mismo reproductor puede tener resultados de fertilidad distintos dependiendo de si es utilizado para IA con detección de celo o en IATF (Hiers et al., 2003; Bó y Callejas, 2008). Hasta el momento, no existen estudios capaces de explicar estas diferencias. Se cree que las diferencias pueden ser explicadas por la longevidad espermática específica del reproductor. En las IATF los márgenes de tiempo son más estrechos, y la variación del tiempo entre la ovulación y el momento de la inseminación puede ser mayor (Saacke, 2009).

Previo al inicio del protocolo, es recomendable la evaluación del semen que se planea utilizar. También es importante que, durante el protocolo, quien descongela y manipula el semen sea una persona capacitada (Butler, 2008).

7.3 Evaluación e importancia de la calidad seminal

Diversos estudios comprueban y demuestran que la calidad seminal y la fertilidad se correlacionan positivamente (Amann y Hammerstedt, 1993; Amann, 1989; Bratton et al., 1956; Christensen et al., 1999; Davis, Graham y Foote, 1987; Freour, Jean, Mirallie y Barriere, 2012; Gerris y Khan, 1987; Gunzel Apel et al., 1993; Irvine et al., 1994; Kathiravan et al., 2008; Koops, Grossman y Den Daas, 1995; Marshburn et al., 1992). El uso de metodologías que permitan describir las características de la fisiología y del funcionamiento espermático, son de especial importancia en la reproducción, ya que representan la única manera de poder estimar la capacidad fecundante de un toro. En la producción de semen bovino,

conocer la calidad seminal de cada toro es un requisito indispensable para posteriormente poder usarlo en técnicas de reproducción asistida (Quintero, Mayorga y Maya, 2016).

Es sabido que las cualidades que los espermatozoides deben tener en un eyaculado fértil son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, membrana funcionalmente integra, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético. Debido a la complejidad y al número de estas cualidades, lograr desarrollar un análisis integral de la función espermática es muy difícil (Hidalgo, Tamargo y Díez, 2005).

La evaluación del semen es parte importante del examen de aptitud reproductiva desde 1950, cuando la aparición de electroeyaculadores confiables permitió implementar la recolección seminal de forma rutinaria (Chenoweth y McPherson, 2016). Parámetros seminales centrales y de creciente importancia tales como la motilidad y la morfología espermática pueden ser evaluadas a nivel de campo sin limitantes importantes, por lo que deberían incluirse en los exámenes de aptitud reproductiva (Beggs et al., 2013).

Chenoweth y McPherson (2016) han demostrado que toros que “pasan” un examen de aptitud reproductiva y/o de semen, tienen una ventaja de fertilidad de 6% o más sobre toros no evaluados; e incluso se esperaría que esta diferencia sea aún mayor si se comparan toros “aptos” con aquellos que no superan el examen.

Un estudio en el norte de Australia evidenció que se lograron producciones más altas de terneros cuando se usaron toros con >70% del espermatozo normal en comparación de toros con <50% de espermatozo normal; de esta forma se concluyó que la calidad de semen, y en particular el porcentaje de espermatozoides normales, presentan una correlación con la producción de terneros alcanzada (Fitzpatrick et al., 2002).

Los toros subfértiles no detectados y usados en rodeos generan grandes pérdidas económicas. Algunas consecuencias, como bajas tasas de preñez son rápidamente detectadas por el productor. Sin embargo, el retraso en la concepción, el aumento de vacas de descarte por estar vacías o por preñarse muy tarde, y el menor peso de los terneros, son consecuencias que pueden generar pérdidas económicas ocultas. Esto generalmente el productor no lo nota, pero se estima que la pérdida en kilogramos de ternero destetado por cada ciclo del servicio en el que la vaca no logra concebir es de 23 a 27 kg. Además, una vez que las vacas paren tarde tienden a hacerlo por el resto de su vida productiva, debido a que el tiempo de recuperación entre el parto y el servicio se acorta (Barth, 2018).

Mekonnen et al. (2010) y Kebede (2018) informaron que la calidad del semen influye en gran medida en el éxito de las IA y en las tasas de concepción alcanzadas. Las tasas de fertilidad son más importantes en los toros que en las vacas, ya que un toro puede servir hasta 40 vacas mediante monta natural, o cientos de miles de vacas a través de programas de IA (Kastelic, 2013).

Varios factores pueden alterar la calidad del semen, como la genética, la raza, la edad, el medio ambiente y factores de manejo. Estos últimos incluyen la nutrición, el proceso de recolección del semen y todos los pasos posteriores hasta que se complete el proceso de congelación y esté listo para su distribución. Además, son importantes las condiciones de almacenamiento del semen después de congelado, las variaciones de temperaturas que sufra, el tipo de transporte al que se lo someta, el tiempo que pasa almacenado después de su distribución y las condiciones de manejo que se tengan al utilizarlo (Pardede, Agil, Yudi y Supriatna, 2020).

Los investigadores de reproducción animal buscan constantemente el desarrollo de un “análisis de semen ideal”, es decir un análisis que de forma sencilla y eficaz permita predecir la fertilidad potencial de un eyaculado (Mellisho, 2010). Este análisis debe incluir una combinación de pruebas que evalúen los diferentes parámetros seminales, ya que la aplicación de una sola prueba resulta insuficiente (Tibisa, Fernández y Gatic, 2002). También se debe considerar que la fertilidad real va a estar influenciada por una serie de variables que no se detectan normalmente en un análisis de semen convencional (Graham y Moce, 2005). Algunas de estas variables pueden ser: el número de espermatozoides presentes en la dosis (Den Daas, 1992), la edad de las hembras inseminadas (Carnevale y Ginther, 1995) y el momento de la inseminación con respecto a la ovulación (Amann, 2005).

Evaluación seminal in-vivo

El método in-vivo, utilizado para determinar la fertilidad de un toro, se realiza por medio de IA o monta natural de un determinado número de vacas, pero el mismo no es aplicable a gran escala ya que es un método altamente costoso y que necesita de periodos largos de tiempo para obtener resultados fiables (Veloz, 2017). Para lograr resultados precisos, este tipo de evaluación requiere de un número relativamente alto de hembras, esto se explica debido a que la fertilidad se comporta como una variable binomial. Por ejemplo, al servir solo 10 vacas las variaciones de fertilidad variarían en un +/- 25%, para disminuir esta variabilidad a un 10% el número de hembras debería llegar a 75, y debería superar las 100 vacas por reproductor para que esta variación sea menor a un 7% (Amann, 1989 y 2005).

Esto ha llevado a que existan pocos estudios de fertilidad in vivo que incluyan un número suficiente de hembras para generar datos confiables de fertilidad, que

permitan luego ser correlacionados con los resultados previos de análisis seminal. Además de un gran número de hembras, para determinar correlaciones precisas entre los resultados de laboratorio y fertilidad del semen sería necesario que se incluya un número amplio de toros que permita abarcar cierta variabilidad en la fertilidad de los mismos (Amann, 2005).

Evaluación seminal in-vitro

Los métodos in-vitro son los más utilizados en la actualidad por tener la característica de ser rápidos y económicos, lo que los hace más accesibles a los centros de evaluación seminal. Como se mencionó anteriormente, estos métodos aún no logran predecir la fertilidad real para una determinada muestra de semen analizada (Veloz, 2017).

Con el objetivo de aumentar el valor predictivo de estas técnicas sobre la fertilidad, es que se recomienda incluir el estudio de la mayor cantidad de variables seminales posibles, más aún si se trata de muestras criopreservadas (Muiño, 2008). En la actualidad existe una gran variedad de pruebas in-vitro, muchas de las cuales evalúan nuevos parámetros seminales que no eran considerados en el espermiograma convencional. Estas pruebas se pueden clasificar en: exámenes convencionales o espermiograma, pruebas funcionales, pruebas para valorar la integridad de la cromatina, test de interacción entre gametos y análisis automatizados de espermatozoides (Veloz, 2017).

Espermiograma

El espermiograma clásico o convencional se caracteriza por ser una prueba sencilla que permite evaluar características macroscópicas y microscópicas del semen. El mismo es parte generalmente del examen andrológico de toros, donde se incluye la evaluación de aspectos macroscópicos como: volumen, color, olor, pH y motilidad masal. Estos parámetros macroscópicos son importantes en el análisis de semen fresco, pero pierden importancia cuando se evalúa semen criopreservado. Por otro lado, el análisis microscópico incluye la valoración de características de motilidad individual, test de espermatozoides vivos-muertos y morfología espermática (Veloz, 2017).

La principal limitante de estas técnicas clásicas de evaluación seminal es que tienen un gran factor de subjetividad, siendo la experiencia y los criterios del observador los determinantes de los resultados (Muiño et al., 2005). Según Valverde (2021), este tipo de evaluación pierde fiabilidad y repetibilidad, lo que lleva a que puedan existir variaciones de incluso un 60% entre diferentes evaluadores.

A pesar de esto, el análisis convencional de semen aún es una gran herramienta ya que, si bien presenta gran variabilidad en sus resultados y escaso poder predictivo de la fertilidad real del semen, sí es capaz de evidenciar aquellas

muestras de baja fertilidad y permite excluirlas de los programas de IA, lo cual tiene un gran impacto económico (Colenbrander, Gadella y Stout, 2003; Graham, 1996; Amann, 1989 y 2005).

Motilidad individual

La valoración de la movilidad espermática es uno de los parámetros más importantes, ya que es necesario que los espermatozoides de una muestra seminal desarrollen un movimiento que sea capaz de asegurar que los mismos lleguen hasta el sitio de fecundación y penetren el ovocito (López, Urbano y Cárdenas, 2012). La sola evaluación de la motilidad no tiene en cuenta habilidades determinantes de los espermatozoides como lo son: la capacitación, la reacción acrosomal y la fertilización en sí (Madrid-Bury, 2005). Esto hace que, aunque exista correlación significativa entre la motilidad y la fertilidad real de una muestra de semen, esta sea baja (Kjaestad, Ropstad y Berg, 1993). Por lo tanto, la motilidad no puede ser considerada como un parámetro único para predecir la fertilidad de un reproductor, sino que simplemente es uno de los puntos importantes de un examen más integral (Liu y Foote, 1998).

En el espermiograma clásico la motilidad individual se cuantifica a través de observar al microscopio óptico una muestra de semen diluido, observando el porcentaje de células móviles. Esta evaluación permite clasificar a los eyaculados con motilidades excelentes (>70%), buenas (50 a 70%), regulares (30 a 50%) o malas (<30%) (Hafez y Hafez, 2000).

Normalmente se establece que las dosis con una motilidad progresiva inferior al 40% sean descartadas para uso en IA (NAAB, 1986). Uslenghi (2016) amplía este concepto y establece que según recomendaciones de la NAAB (National Asociation of Animal Breeders, USA) el movimiento puede clasificarse por la velocidad del movimiento progresivo en una escala de 0 al 5 (0= sin movimiento, 5= movimiento rápido donde es difícil seguir una célula). Según este autor, las muestras de semen a utilizar en IA deben de tener como mínimo un 25% de células progresivas, con una velocidad de al menos 3 al momento de la descongelación, y luego de dos horas de incubación a 37°C, aún deben existir al menos 15% de espermatozoides con motilidad progresiva, con una velocidad clasificada como 2. Sin embargo, reglamentariamente en el Mercosur se establece que luego del descongelado las muestras de semen bovino deben de tener un porcentaje mayor al 30% de espermatozoides morfológicamente normales y con movimiento progresivo (Resolución GMC N° 46/996) (Grupo Mercado Común, 1996).

Además de valorar el porcentaje de células móviles y la velocidad de las mismas, se puede calificar el tipo de movimiento que desarrollan las células espermáticas, evaluando el porcentaje de células con movimiento rectilíneo, movimiento en el lugar (por ejemplo, circular) e inmóviles (Rutter y Russo, 2006). La clasificación en estos patrones de movimiento es importante, ya que se ha demostrado que

se correlaciona con la fertilidad potencial de la muestra, brindando información sobre la integridad morfológica y de las membranas plasmáticas de los espermatozoides (Cuberlo y Rodríguez, 2013).

Los resultados de la evaluación de motilidad mediante espermiograma, presentan una variabilidad entre observadores de entre un 30% a un 80% (Amann, 1989; Auger et al., 1993; Barros, Fujimoto y Yanagimachi, 1973; Budworth, Amann y Chapman, 1988; Chan et al., 1989). Debido a esto, la fiabilidad de los resultados brindados por distintos evaluadores es cuestionable (Dott y Foster, 1979). Esto dificulta la capacidad de estimar el potencial reproductivo de un toro mediante este método. De todos modos, el espermiograma es la forma más accesible y económica de determinar la calidad del movimiento espermático en una muestra de semen (Morado et al, 2015; Sharma, Singh, Sharma y Kumar, 2016).

Morfología espermática

El análisis de las características morfológicas de los espermatozoides presentes en un eyaculado es uno de los puntos principales de la evaluación seminal (Rivera, 2013). Esta evaluación se puede realizar mediante la tinción de los espermatozoides con diferentes técnicas de coloración. La eosina-nigrosina, eosina-anilina azul (Koziol y Armstrong, 2018), y la tinta china son las tinciones sugeridas por la Sociedad de Teriogenología (Paez y Corredor, 2014). Otras técnicas utilizan frotis húmedos e iluminación de contraste de fase (PhC; Barth y Oko, 1989) o de contraste diferencial de luz polarizada (DIC; Perry, 2021), con una sencilla preparación de muestras, pero requiere de microscopio más equipados.

La morfología espermática normal y la fertilidad en toros se relacionan positivamente (Hammerstedt, 1996; Saacke y White, 1972) aunque la magnitud de esta relación aún permanece incierta. De manera inversa, se ha establecido que existe una correlación negativa entre la cantidad de anomalías espermáticas y la fertilidad de los reproductores, por tanto, se asocia la presencia de morfoanomalías en un eyaculado con la reducción de la fertilidad. Hasta el momento se desconoce cuál es el porcentaje máximo de las mismas, que puede ser compatible con una fertilidad normal (Barth y Oko, 1989; Januskauskas y Žilinskas, 2002).

Se ha reportado que un buen eyaculado no debería de presentar más de un 30% de morfoanomalías espermáticas totales (Vilanova y Balladares, 2005). Bó et al. (2005) afirman que un eyaculado debería tener un mínimo de 70% de espermatozoides morfológicamente normales, y agregan distinciones según la ubicación de las anomalías. Los defectos de cabeza no deberían superar el 15-20%, y los defectos de colas y acrosomas deberían ser menores al 25%. Por otro lado, Hafez y Hafez (2000), indican que, en los toros, cuando las células

espermáticas anormales exceden el 20%, es característico que la fertilidad disminuya. Esto es similar a lo reportado por Ball y Peters (2004), quienes informaron que los toros con anomalías totales de esperma >17% tienen bajas tasas de fertilización. Es por lo anteriormente mencionado que la evaluación morfológica no solo incluye determinar el porcentaje de espermatozoides anormales, sino que también es necesario determinar la cantidad y el tipo de estas anomalías (Paez y Corredor, 2014).

Según Muiño et al. (2005) existen diferentes formas de clasificar las anomalías espermáticas, las cuales responden a distintos criterios:

- Según el origen de la anomalía, podemos clasificarlas en primarias o secundarias. Las primarias son aquellas que tienen lugar durante la espermatogénesis por lo que se generan a nivel testicular, mientras que las secundarias son aquellas que se producen posterior a la espermatogénesis y por lo tanto se pueden generar a nivel del epidídimo, en los conductos o post eyaculación (Barth y Oko, 1989).
- Según el impacto en la fertilidad, las alteraciones espermáticas pueden ser clasificadas como mayores o menores, siendo las alteraciones mayores aquellas que están relacionadas directamente con infertilidad (Blom, 1977).
- Otra posible clasificación involucra un aspecto más tecnológico, de esta manera las anomalías se clasifican como compensables o no compensables. Las anomalías no compensables son aquellas que comprometen la fertilidad ya que estos espermatozoides son capaces de alcanzar el ovocito y penetrarlo, compitiendo con los espermatozoides normales y dando como resultado un posible embrión no viable. Las anomalías compensables son aquellas que comprometen a tal punto el movimiento y desplazamiento de los espermatozoides, que hacen que les resulte imposible llegar al ovocito y mucho menos penetrarlo. Estos últimos no son competencia para los espermatozoides normales del eyaculado, por lo que su presencia se puede compensar aumentando el número de espermatozoides en la dosis seminal (Saacke, Nadir y Nebel 1994).
- La última clasificación refiere al lugar en donde se encuentra la anomalía en el espermatozoide, por lo que se las clasifica en anomalías de cabeza, de pieza intermedia o de cola.

A pesar de esta clasificación, cualquier tipo de anomalía puede comprometer la fertilidad si se encuentra afectando a un número alto de espermatozoides, si bien es cierto que algunas son más graves que otras (Muiño et al., 2005).

Varios estudios han demostrado que la evaluación subjetiva de la morfología espermática mediante un operario calificado, difícilmente logre predecir la capacidad fecundante de la muestra, ya que solo una población de los

espermatozoides del eyaculado es capaz de atravesar el moco cervical (Hanson y Overstreet, 1981; Mortimer et al., 1982) y llegar al sitio de fertilización (Saacke y White, 1972).

Concentración espermática

La concentración espermática es otro de los parámetros importantes a determinar en la evaluación seminal, ya que, el número de espermatozoides presentes en la dosis seminal, tiene una gran relación con la fertilidad esperada (Gomez y Migliorisi, 2015).

Esta evaluación se realiza sobre todo con semen fresco en los centros de inseminación, donde determinar la concentración espermática de un eyaculado es importante para establecer el número de pajuelas obtenibles a partir del mismo (Pérez-Holanda, 1996). Por lo general en estos centros, debido al gran número de eyaculados que deben analizar, utilizan espectrofotómetros lo cual agiliza el trabajo (Catena y Cabodevilla, 1999). Existen otros métodos para determinar la concentración, como por ejemplo el uso de hemocitómetro, e incluso también puede ser determinada de manera macroscópica y subjetiva, lo cual requiere de la experiencia del operario (Palma, 2010).

En la producción comercial de semen bovino congelado, el número mínimo de espermatozoides por pajuela necesario para obtener la máxima capacidad fecundante se ha establecido en 15 millones, con al menos el 50% de motilidad progresiva post descongelación (Van Lieshout, 1995). Uslenghi (2016) por otro lado, menciona que, la concentración estándar de una dosis de semen debe ser de entre 5 a 10 millones de células móviles progresivas, aunque generalmente se toma como límite 8 millones. Además, agrega que habitualmente se prefiere trabajar con motilidades progresivas mayores a 30%. Las dosis seminales producidas en centros de toros normalmente superan los mínimos establecidos, buscando que existan al menos 10 millones de espermatozoides con motilidad progresiva en cada dosis (Muiño et al., 2005).

Pruebas de funcionalidad espermática

Las membranas espermáticas desempeñan un papel fundamental en la fertilización por parte del espermatozoide, estas estructuras dinámicas son capaces de adaptar el metabolismo celular al medio en el que se encuentran, participando en la capacitación y en la reacción acrosómica (Hidalgo et al., 2005). Debido a la composición de la misma, es el principal sitio donde ocurren alteraciones durante los procesos de criopreservación (Quintero et al, 2016). Por lo tanto, el estudio de su integridad funcional cobra gran relevancia en la evaluación de la fertilidad del macho (Hidalgo et al., 2005),

Es sabido que la integridad funcional de la membrana plasmática y acrosomal refleja la viabilidad espermática (Tartaglione y Ritta, 2004). La correlación entre

viabilidad espermática y capacidad fecundante de una dosis seminal se ha intentado demostrar por varios investigadores, encontrando discrepancias entre estos. Por un lado, Decuadro et al. (2002) y Christensen et al. (2004), marcan que existe una correlación alta entre ambas variables, siempre y cuando se respete una concentración mínima de espermatozoides por pajuela. Pero Graham (2001) encontró resultados contradictorios, y afirma que la viabilidad espermática se correlaciona de forma baja con la fertilidad.

El test hiposmótico es una prueba sencilla y de gran valor predictivo para evaluar la funcionalidad de las membranas, el mismo consiste en colocar los espermatozoides en un medio con menor presión osmótica que la fisiológica, lo que lleva que los espermatozoides con las membranas intactas permitan el ingreso de agua hasta equilibrar presiones, lo que hace que enrollen sus colas. Por otro lado, aquellas células con las membranas dañadas no van a sufrir cambios en la forma de su flagelo. Esta prueba fue puesta a prueba por Quintero et al., (2011), quien al utilizar este test en semen criopreservado demostró que el mismo puede ser utilizado para predecir el potencial reproductivo en toros. Además, se ha demostrado que el resultado de este test se correlaciona positivamente con otros parámetros de calidad seminal, como motilidad, viabilidad y morfología (Hidalgo et al. 2005).

Pruebas para evaluar la integridad de la cromatina

El avance de la tecnología y el desarrollo de nuevas técnicas de evaluación seminal han demostrado la importancia de la integridad del ADN espermático, el cual no solo influye en la fecundación, sino que también es esencial para las primeras etapas del desarrollo embrionario (Agarwal y Said, 2003; Gil-Villa et al., 2009, 2010; Rodriguez et al., 2011). Para que la fecundación tenga lugar, el espermatozoide no solo debe tener la capacidad de llegar al oviducto y sufrir una correcta capacitación, que le permita penetrar en el ovocito, sino que además este espermatozoide debe ser capaz de transportar en su núcleo la información genética que permita el desarrollo de un embrión viable. El espermatozoide maduro no posee mecanismos significativos de reparación del ADN, por lo que luego de la maduración cualquier factor que pueda modificar la integridad de su ADN puede generar una menor fertilidad del mismo (Hughes et al., 1997).

Este tipo de alteraciones tienen un gran impacto a nivel económico, tanto en los centros de IA como en los predios comerciales, ya que a pesar de tener una baja prevalencia este tipo de defectos son “no compensables”; lo que significa que la disminución en la fertilidad no es solucionable aumentando el número de espermatozoides por dosis inseminante. Estos espermatozoides logran la fertilización del ovocito, y llevan al desarrollo de embriones no viables. En casos donde no se pierde la gestación, estas anomalías, provocan defectos hereditarios en la descendencia. Por este motivo, es que se intenta la identificación temprana de estos reproductores y también disminuir al mínimo los factores de riesgo que llevan a este tipo de alteraciones (Bolarín, 2016).

Elevados niveles de fragmentación del ADN han sido asociados muchas veces a espermatozoides con movilidad reducida y con alteraciones morfológicas (Lopes, Jurisicova, Sun y Casper, 1998; Zini et al., 2001), sin embargo, también se ha demostrado que espermatozoides con alteraciones en el ADN pueden presentar movilidad y morfología normal, con consecuentes problemas de fertilidad (Evenson et al., 1999). Bochenek, Smorag y Pilch (2001) reportan que la fertilidad de los machos disminuye cuando la cromatina está dañada o cuando la fragmentación del ADN alcanza el 10%. Esto es similar a lo reportado por otros estudios, quienes reportan que hasta un 15% de fragmentación del ADN es normal, pero a partir de este nivel la fertilidad se reduce y al superar el 25%, se considera infértil (Larson-Cook et al., 2003).

Eid, Lorton y Parrish (1994) encontraron que toros de alta y baja fertilidad in vivo, tuvieron similares tasas de fertilización in vitro, pero los embriones producidos por la fecundación de espermatozoides con baja fertilidad presentan un desarrollo embrionario más lento. Los autores asocian esta diferencia a la presencia de mayores alteraciones genéticas en estos espermatozoides, lo que llevaría a retrasos en el desarrollo embrionario y una menor fertilidad por pérdida de los mismos.

En la actualidad se han desarrollado una serie de pruebas que permiten detectar daños a nivel del ADN espermático, ya sea de forma directa o indirecta, como son los test: TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labelling), COMET ASSAY (Electroforesis celular individual), AOT (Acridine Orange Test), SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) o el SCD (Sperm Chromatine Dispersion test; Sperm-Sus-Halomax®) (Bolarín, 2016). Estas técnicas poseen una gran confiabilidad y repetibilidad, pero tienen la gran limitante de que no todos los laboratorios tienen acceso a los equipos necesarios y al personal capacitado para su implementación, lo que limita en gran medida la integración de estas pruebas al análisis seminal rutinario (Evenson, Larson y Jost, 2002; Schlegel y Paduch, 2005; Quintero et al., 2016).

Test de interacción entre gametos

Se han desarrollado ensayos que evalúan la capacidad de los espermatozoides para unirse a la zona pelúcida y/o penetrar/fertilizar ovocitos in vitro. Estos ensayos evalúan la efectividad (concentración y capacidad) de los receptores espermáticos para unirse al ovocito, el oolema e iniciar la fertilización. La mayoría de estos ensayos requieren equipos especiales y mucho tiempo, además son costosos de realizar (Graham y Moce, 2005).

En primer lugar, se encuentra el ensayo de unión a zona pelúcida, donde los espermatozoides son incubados durante un tiempo determinado y se observa el número de estos que efectivamente se unen a zonas pelúcidas. Una de las

principales limitantes de estos ensayos es la obtención de zonas pelúcidas, aunque una forma más simple es la utilización de membranas peri vitelina del huevo de gallina la cual presenta cierta similitud molecular a la zona pelúcida, por lo que los espermatozoides de muchas especies se unen a la misma (Graham y Moce, 2005).

En el ensayo de penetración de ovocitos se utilizan ovocitos de diferentes especies a los que se les extrae la zona pelúcida para evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides. La capacitación espermática y el estado del acrosoma son evaluados mediante este ensayo, ya que solo los espermatozoides correctamente capacitados y capaces de desarrollar una correcta reacción acrosomal pueden penetrar los ovocitos. La desventaja de este ensayo es que, al utilizar ovocitos sin zona pelúcida, no se puede evaluar como los espermatozoides atraviesan una de las barreras más importantes para la fertilización (Graham y Moce, 2005).

También existen ensayos de fecundación in vitro, donde se evalúa la capacidad de los espermatozoides para fertilizar ovocitos homólogos in vitro. El cultivo de los cigotos permite evaluar la integridad genética de los espermatozoides. Se debe tener precaución al interpretar los datos recopilados, ya que los ovocitos madurados in vitro actúan de manera diferente a los ovocitos madurados in vivo, tanto en su capacidad para fertilizarse como en su desarrollo posterior después de que se haya producido la fertilización (Graham y Moce, 2005).

Análisis automatizados de espermatozoides

Con el fin de eliminar la subjetividad de la interpretación humana y aumentar la velocidad de la evaluación de los parámetros seminales, se han desarrollado tecnologías de análisis automático, entre las que se destacan (Graham y Moce, 2005):

Citometría de flujo

Mediante la citometría de flujo, las células previamente teñidas con fluorescencia, ingresan en una corriente confinada de fluido que pasa por un rayo láser. Estas células, de manera individual, son detectadas y contadas a una velocidad que puede alcanzar las 50.000 células por minuto. Además, combinando diferentes tintes se pueden contar diferentes atributos de las células que resultan interesantes de evaluar. Hoy en día, gracias a una gran disponibilidad de sondas fluorescentes, es posible evaluar casi cualquier atributo celular (Graham y Moce, 2005).

Análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA)

Los sistemas computarizados de análisis seminal (CASA) surgen como sistemas fiables y objetivos que permiten valorar de forma rápida la calidad seminal. Si bien en un principio esta tecnología era poco accesible, hoy en día se encuentra

en la mayoría de los centros de evaluación seminal. Esta técnica, al disminuir la variabilidad propia de la subjetividad del análisis tradicional, debería garantizar una mejor correlación con la capacidad fecundante real de una muestra de semen (Valverde y Madrigal, 2018).

Los primeros sistemas CASA aparecieron en la década del setenta. Estos se basaban en técnicas con iluminación estroboscópica que dejaban un halo de movimiento sobre una película fotográfica, obteniendo los primeros valores objetivos mediante métodos directos (Overstreet et al., 1979). Esto fue lo que abrió la puerta a sistemas semiautomáticos que se basaban en tabletas gráficas, hasta el desarrollo de sistemas completamente automáticos para el análisis de la cinética espermática (Valverde y Madrigal, 2018). Los primeros sistemas pioneros continuaron el desarrollo, y con el creciente interés en su uso se comenzó a integrar el análisis morfométrico, aunque debido a la complejidad del mismo aún no se ha generalizado su uso (Gil et al., 2009).

7.4 Características de los sistemas computadorizados CASA

Existen en el mercado varios sistemas CASA destinados a uso veterinario, estos difieren en varios aspectos según su fabricante. Las principales diferencias se deben a la óptica, al software y a los algoritmos utilizados, los que posibilitan identificar, clasificar y reconstruir el movimiento y trayectoria de los espermatozoides (Marshburn et al., 1992; Krause, 1995; Coetzee, Kruger y Lombard, 1999). Debido a esto, muchas veces los resultados obtenidos no pueden ser comparados entre laboratorios que utilizan sistemas CASA distintos. Con el objetivo de lograr resultados confiables, repetibles y comparables, es que la OMS sugirió pautas específicas para el uso de estos sistemas (Organización Mundial de la Salud, 2010), las cuales no son adoptadas por todos los laboratorios de la práctica clínica ni de investigación (Nagy et al., 2015).

Generalmente estos equipos consisten en un microscopio de contraste de fase negativo, que permite observar los espermatozoides blancos sobre un fondo oscuro. Esto permite, a diferencia de los de fase positiva, mantener siempre visible la cabeza de los espermatozoides independientemente del movimiento. Además, facilita la visualización de las colas, disminuyendo las posibilidades de clasificar como espermatozoides a otras partículas similares que aparezcan en la muestra (Valverde, 2021).

A este microscopio se le asocia una cámara de alta resolución, un escáner de imágenes y una computadora programada con un software específico para analizar y almacenar la información recibida. Los programas informáticos, son propios de cada marca de sistemas CASA, y por tanto son la fuente de que en ocasiones se encuentren variaciones en los resultados si se los compara. Sin embargo, es importante entender que más allá de estas variaciones, todos los

sistemas CASA parten de un mismo conjunto de técnicas de análisis de imágenes (Valverde, 2021).

Mediante la obtención de imágenes sucesivas, estos dispositivos logran recrear la trayectoria de los espermatozoides, obteniendo así varios parámetros de movilidad y concentración espermática. Además, como manera de verificar que todos los espermatozoides del campo evaluado fueron identificados y que su trayectoria fue reconstruida correctamente, estos equipos permiten la revisualización de los videos evaluados (Valverde, 2021).

Principales evaluaciones de los sistemas CASA

Motilidad/Cinética

Los sistemas CASA permiten describir características del movimiento flagelar de los espermatozoides y asociarlas al estatus funcional de los mismos (Kastelic y Thundathil, 2008). Estos sistemas permiten obtener de forma precisa, objetiva y repetible un conjunto de datos sobre la trayectoria y velocidad del movimiento de cada espermatozoide, evaluando la proporción de células móviles y la calidad de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar et al. 1991).

Según Bernardi et al. (2011), las descripciones de motilidad que brinda el CASA incluyen:

- Porcentaje de espermatozoides motiles totales (MT): porcentaje de células que tienen movimiento.
- Porcentaje de espermatozoides progresivos (MP): porcentaje de células que, siendo motiles, describen un desplazamiento hacia delante.
- Concentración de espermatozoides progresivos por dosis.
- Velocidad curvilínea (VCL): velocidad calculada sobre el camino real del espermatozoide entre dos puntos de su trayectoria, expresada en micrones por segundo. Describe la motilidad real de los espermatozoides.
- Velocidad rectilínea (VSL): velocidad del espermatozoide sobre una línea recta entre dos puntos medida en micrones por segundo.
- Velocidad promedio de trayectoria (VAP): velocidad promedio del espermatozoide sobre el camino real del expresada en micrones por segundo.
- Linealidad ($LIN = VSL/VCL$): desviación de la velocidad del camino real a la velocidad en línea recta expresada en porcentaje.
- Rectilinearidad ($STR = VSL/VAP$): desviación de la velocidad promedio a la velocidad en línea recta expresada en porcentaje.
- Oscilación ($WOB = VAP/VCL$): es una medida de oscilación de la trayectoria real sobre la trayectoria promedio expresada en porcentaje
- Amplitud lateral de la cabeza (ALH): distancia promedio del desplazamiento de la cabeza desde la posición media del camino, expresada en micrones.

- Frecuencia de batido (BCF): frecuencia de corte de los movimientos laterales de la cabeza del espermatozoide, expresada en Hertz (Hz).
- Actividad de la cabeza (HAC): Actividad cabeza espermática, frecuencia de orientación promedio del cambio de movimiento de la cabeza.
- Distancia en el camino promedio (DAP): distancia promedio expresada en micrones por segundos.
- Distancia en línea curva (DCL): distancia recorrida calculada sobre el camino real del espermatozoide y expresada en micrones por segundo.
- Distancia en línea recta (DSL): distancia recorrida calculada sobre la línea recta que une el punto inicial con el final de la trayectoria, expresada en micrones por segundo.

Los parámetros VCL, ALH y BCF se consideraron medidas que reflejan el vigor de los espermatozoides, y los parámetros VSL, STR y LIN la progresividad.

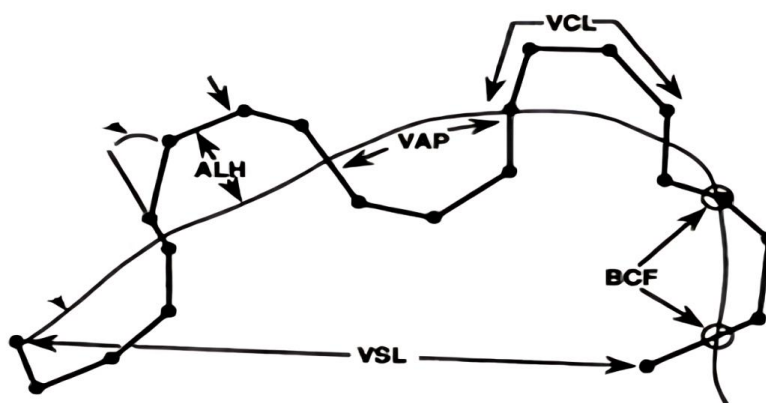


Figura 3: Representación esquemática del movimiento de un espermatozoide, mostrando parámetros cinéticos (Tomado de Juárez, 2009). ALH= Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; VSL= Velocidad rectilínea (o progresiva); VCL= Velocidad curvilínea, y VAP= Velocidad de la trayectoria media y BCF= Frecuencia de batido.

El análisis de motilidad mediante sistemas CASA, permite predicciones más precisas de la fertilidad esperada en comparación con el análisis de la misma mediante el espermiograma tradicional (Broekhuijse et al., 2012; Christensen et al., 1999; den Daas, 1992). Los parámetros cinéticos que brinda el CASA, se han intentado correlacionar en repetidas ocasiones con la tasa de penetración de ovocitos, con la tasa de fertilidad in vivo y con la fertilidad a campo (den Daas, 1992; Kathiravan et al., 2008).

La proporción de espermatozoides móviles y la velocidad de los mismos, fue correlacionada significativamente con la fertilidad por Budworth et al. (1988). De la misma manera, Amann (1989), utilizando semen bovino criopreservado, demostró correlaciones existentes entre características de motilidad y velocidad (tales como motilidad total, VCL, VSL, LIN y BCF) y la fertilidad. Sin embargo, años más tarde, Amann y Wabernski (2014) concluyeron que no es posible

predecir con precisión el potencial fertilizante de una muestra de semen a utilizar en IA, mediante la evaluación de su motilidad. A pesar de esto, recomiendan la utilización de parámetros tales como la VCL y la STR para clasificar a los espermatozoides en diferentes grupos: 1- inmóviles (VCL cercana a cero), 2- indeseables (VCL o STR bajos) y 3- satisfactorios (VCL y STR cumplen con estándares).

Por su parte, Farrell et al (1998) demostraron correlaciones muy altas entre los parámetros cinéticos que brinda el CASA y la fertilidad obtenida en inseminaciones con semen fresco. La correlación encontrada al combinar diferentes parámetros cinéticos presentó valores de r^2 superiores en comparación a los obtenidos con los parámetros de forma individual. Un ejemplo de esto, es que la combinación de ALH, BCF, LIN, VAP y VSL obtuvo un $r^2 = 0,98$, mientras que para la MT el coeficiente de determinación fue de 0,34. De igual manera Oliveira et al. (2013) encontraron altas correlaciones al combinar parámetros cinéticos y fertilidad utilizando semen criopreservado. Además, en este trabajo se encontró que la evaluación del semen luego de 2 horas de descongelado e incubado, aumenta el valor predictivo de los parámetros de movilidad espermática, estableciendo como los predictores más importantes a la MT, MP, MPR y BCF.

Zhang et al. (1998), encontraron en su investigación una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de espermatozoides con patrón de movimiento lineal y la fertilidad in vivo de muestras de semen criopreservadas, mientras que Cseh et al. (2004, según Simonik et al., 2015) encontraron una correlación fuerte y significativa entre el VAP y la fertilidad in vivo. Además, estos últimos reportaron que toros con valores bajos de VCL (22,51 – 79,5 $\mu\text{m/s}$); VSL (11,35 – 35,71 $\mu\text{m/s}$) y VAP (12,67 – 34,45 $\mu\text{m/s}$) presentan una menor fertilidad.

En otro trabajo de Gillan et al. (2008), se concluyó que sólo los parámetros VSL, VCL, ALH y BCF estarían involucrados en la predicción de la fertilidad in vivo mediante su combinación. Esto difiere a otros estudios realizados por Farrell et al. (1998), Cseh et al. (2004, según Simonik et al., 2015) y Oliveira et al. (2013), ya que estos autores encontraron que la mayoría de los parámetros evaluados por CASA no se correlacionan por sí solos con la fertilidad, aunque sí lo hacen al combinarse entre ellos.

Nagy et al. (2015), por otro lado, demuestran en una investigación que involucró el servicio de 8909 vacas con semen criopreservado proveniente de 10 toros, que los valores de velocidad promedio (VCL, VSL y VAP) de una muestra de semen se correlacionan positivamente con la tasa de no retorno al celo. La correlación hallada presenta una alta significancia y coincide con lo encontrado por otros investigadores, quienes afirman que las velocidades promedio pueden predecir de manera individual la capacidad fecundante de muestras de semen criopreservado (Byrd et al., 1990; Chan et al., 1989; Fetterolf y Rogers, 1990;

Krause, 1995). En el estudio de Nagy et al. (2015), luego de verificar la correlación existente entre las velocidades promedio mencionadas, se concluyó que es el VAP quien presenta, de manera individual, una mayor correlación con la tasa de no retorno al celo ($r = 0,7029$ ($P = 0,023$)), y es, por tanto, el mejor parámetro para intentar predecir fertilidad.

Esta situación es bastante similar a lo que ocurre en otras especies, donde la motilidad valorada por CASA ha sido correlacionada positivamente con la capacidad fecundante de los espermatozoides en humanos (Fetterolf y Rogers, 1990; Larsen et al., 2000; Hirano et al., 2001; Verstegen et al., 2002) y en cerdos (Broekhuijse et al., 2012).

Morfología/Morfometría

Para el estudio de la morfometría existen diferentes técnicas, las que utilizan microscopía de campo claro requieren de la fijación de las células en un frotis seco y tinción de las células, lo que permite diferenciar los espermatozoides del medio y de sus diferentes piezas (acrosoma, cabeza, pieza intermedia y cola). De esta forma se puede estudiar el tamaño y forma de la cabeza de los espermatozoides, la proporción de la cabeza ocupada por el acrosoma, las dimensiones de la pieza intermedia y su inserción en la cabeza (Valverde y Madrigal, 2018; Álvarez-Lledó, 2003; Gil et al., 2009).

Los programas objetivos de morfometría miden la longitud de la cabeza [L], el ancho [W], el área (número total de píxeles) [A] y el perímetro [P] (Amann y Katz, 2004; Martí et al., 2012), esto permite calcular otros parámetros de forma como son la elipticidad, la elongación, la rugosidad y la regularidad para cada cabeza de espermatozoide (Valverde y Madrigal, 2018).

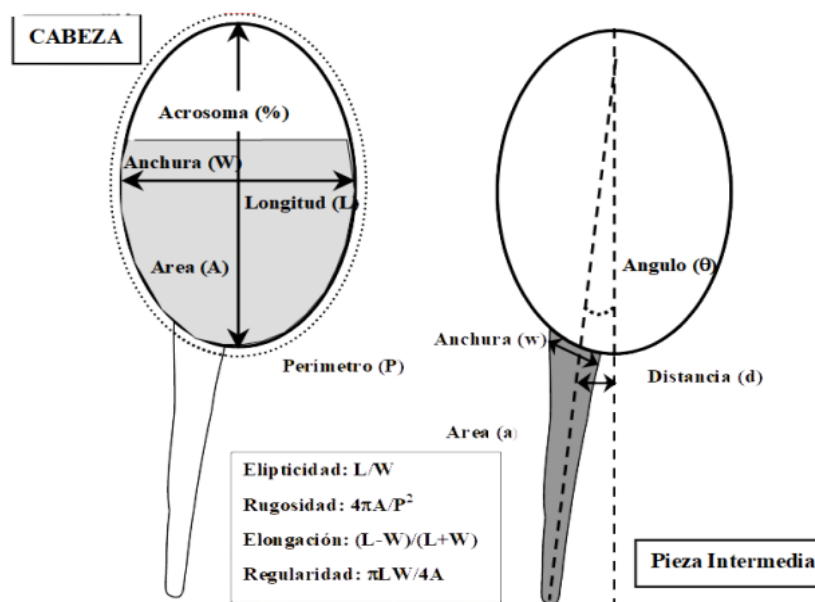


Figura 4: Parámetros morfológicos de la cabeza del espermatozoide (Tomado de Soler et al., 2005). Tamaño de la cabeza del espermatozoide: anchura (W; μm), longitud (L; μm), perímetro (P; μm), área (A, μm^2), el porcentaje de acrosoma, los parámetros de forma: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad, que son adimensionales. Los parámetros de la pieza intermedia del espermatozoide: distancia (d; μm), anchura (w; μm), área (a; μm^2) y ángulo de inserción (θ).

Estudios de Liu y Baker (1992) evaluaron la biometría de la cabeza de los espermatozoides, donde encontraron que aquellos de cabezas anchas y mayor área, tienen una mayor unión a nivel de la zona pelúcida. Sin embargo, estudios más recientes evidenciaron que toros con una mayor fertilidad in vivo, producían espermatozoide con dimensiones de cabeza menores en comparación con aquellos de menor fertilidad (Rubio et al., 2007).

Concentración

La evaluación de la concentración espermática por parte de los sistemas CASA, puede hacerse por medio de las cámaras que se usan para analizar motilidad, o por medio de cámaras Makler o Spermtrack®, configuradas para el equipo en cuestión (Cucho, 2018).

Si bien los nuevos sistemas CASA incluyen dentro de sus aplicaciones la determinación de la concentración, se ha reportado que la determinación de la misma mediante estos sistemas, es un método con mayor margen de error que otros, tales como el recuento con hemocitómetro (Verstegen et al., 2002). Estos sistemas pueden generar una subestimación o sobrestimación del número de espermatozoides debido a diferentes motivos como la presencia de colisiones con recuentos dobles de un mismo spz (Coetzee et al. 2001), el efecto Segre-Silberberg por la cámara utilizada (Kuster, 2005; Douglas-Hamilton et al., 2005), los algoritmos utilizados (Douglas-Hamilton et al., 2005) y el diluyente utilizado (Verstegen et al. 2002; Hansen et al. 2006). Hoy los sistemas han mejorado usando una única imagen para concentración evitando las colisiones

y otras fuentes de error. Aun así, el uso de los sistemas CASA para determinación de la concentración espermática en centros de IA de toros es sustituido por otros métodos con un mayor grado de exactitud como el Nucleo Counter® (Amann y Waberski, 2014).

Fragmentación del ADN

La evaluación del nivel de fragmentación del ADN cada vez toma mayor relevancia, en un principio fue desarrollado para el ser humano (Fernández et al., 2003), pero luego se extrapolo a otras especies productivas incluidas el toro (García et al., 2007) y verraco (Enciso et al., 2006), siendo un método rápido y sencillo por lo que puede sumarse al análisis convencional.

Para esta valoración la muestra a evaluar debe recibir un tratamiento previo que es variable según los diversos protocolos, uno de los más utilizados es Halotech® en donde las células con un ADN íntegro producen un halo de mayor tamaño que aquellas con fragmentación, la cuantificación de este halo permite asociarlo al grado de integridad del ADN (Valverde y Madrigal, 2018).

Actividad mitocondrial e integridad de acrosomas, membranas y ADN

Mediante la fluorescencia es posible valorar el estado de diversos organelos espermáticos, como la membrana de la cabeza espermática y realizar pruebas de vitalidad espermática. A su vez, también permitiría otros análisis relacionados al estado funcional de las mitocondrias de la pieza intermedia, acrosomas, y del núcleo (Valverde y Madrigal, 2018). Los fluorocromos pueden conjugarse a moléculas con afinidad específica a determinados componentes celulares, permitiendo visualizar su presencia y estado para identificar muestras de baja calidad (Petrunkina y Harrison, 2013).

Análisis de subpoblaciones

Como se mencionó anteriormente, la investigación andrológica en los últimos años ha dejado de considerar al eyaculado como una única unidad homogénea, reconociendo que existen en el mismo diferentes subpoblaciones de espermatozoides. Esta heterogeneidad hace suponer, que a pesar de que la fecundación es lograda por un solo espermatozoide, el mismo requiera de la colaboración de espermatozoides con diferentes patrones de movimiento, lo cual ha cambiado el criterio que antiguamente se utilizaba en la evaluación seminal (Valverde y Madrigal, 2018).

La diversidad de subpoblaciones espermáticas, con cinética y morfometría diferente, ha sido demostrada mediante el uso de sistemas CASA en combinación con la estadística multivariada (Dorado et al., 2010; 2011a; 2011b; Esteso et al., 2009; Hidalgo et al., 2008; Maroto et al., 2012; Miró et al., 2009; Muiño et al., 2008). Esto puede explicar por qué toros con una movilidad similar a la evaluación convencional, pero con diferentes patrones en sus

subpoblaciones, presentan diferentes resultados de fertilidad (Holt y Van Look, 2004; Ibanescu et al., 2020; Ibănescu et al., 2018).

Ferraz et al. (2014) correlacionaron espermatozoides rápidos y progresivos con mejor capacidad de congelación y también con mejores tasas de fertilización. Sin embargo, un estudio reciente, informó que existe una correlación positiva entre la proporción de espermatozoides con movimientos rápidos y no lineales y las tasas de no retorno al celo (Ibanescu et al., 2020).

Hidalgo et al. (2021) estudiaron las subpoblaciones presentes en los eyaculados de toros, obteniendo 4 subpoblaciones bien definidas: SP1 (esperma rápido y progresivo), SP2 (esperma lento y progresivo), SP3 (esperma rápido y no lineal) y SP4 (esperma lento y no lineal). Posterior a esto se seleccionaron reproductores aptos, provenientes de un centro de inseminación y se agruparon según su tasa media de preñez, en “baja” (< 52,27%) o “alta” (>52,27%). Los eyaculados de estos toros fueron clasificados en las distintas subpoblaciones halladas anteriormente, y los resultados mostraron que: la subpoblación espermática predominante en el grupo “baja” fue SP2, identificados por valores bajos de los parámetros VAP, VCL, ALH y DANCE (VCL x ALH) y valores altos de STR, lo que explicaría el bajo rendimiento de los toros clasificados en este grupo. Según Liu, Garrett y Baker (2003), la baja fertilidad parece estar más relacionada con una menor proporción de espermatozoides que tienen la capacidad de fertilizar un ovocito, que con una disminución de esta capacidad en todos ellos. Por otro lado, en el grupo “alta”, los resultados indicaron que la subpoblación predominante era SP3, lo que es característico de los patrones celulares hiperactivados. La cinética de las células hiperactivadas se caracteriza por un movimiento vigoroso y no lineal, con una alta amplitud y latido flagelar asimétrico, que permite que los espermatozoides penetren en la zona pelúcida (Ho et al., 2002; Kathiravan et al., 2011). Estos resultados se corroboran con otros estudios que han indicado que la proporción de espermatozoides con un patrón hiperactivado era mayor en toros con mayor fertilidad (Murase et al., 2010; Shojaei et al., 2012; Van Der Horst, 2014). Se concluyó que el parámetro DANCE (VCL x ALH) explicó el 47% de la variación en la fertilidad de los toros ($R^2 = 0,4749$). Este parámetro se utiliza para determinar la motilidad hiperactivada en los espermatozoides, (Holt, O'Brien y Abaigar, 2007) y esta determina en cierto modo la variabilidad en la fertilidad obtenida.

También Ibanescu et al. (2020) correlacionaron las subpoblaciones de espermatozoides de toro con características de calidad seminal, concluyendo que los eyaculados con mayor proporción de membranas plasmáticas intactas contienen más espermatozoides con movimientos rápidos y no lineales, lo que concuerda con los resultados de Hidalgo et al., (2021).

Aunque el sistema CASA permite la evaluación de la cinética de los espermatozoides y el registro individual de su trayectoria, existe una

subutilización de esta herramienta, ya que proporciona sólo valores medios de la cinética espermática, asumiendo que el eyaculado es uniforme, lo que provoca una pérdida de información importante (Martínez-Pastor et al., 2011).

8. HIPÓTESIS

Los parámetros de cinética espermática proporcionados por el sistema CASA permiten explicar la fertilidad in vivo obtenida en protocolos de IATF con semen bovino criopreservado, y por tanto, es posible predecir a través de ellos la fertilidad potencial de una muestra de semen.

9. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la aplicabilidad del uso del sistema CASA en semen bovino criopreservado, como predictor de la fertilidad esperada en programas de IATF en rodeos de cría de Uruguay.

Objetivos específicos

Demostrar la existencia de correlación entre los parámetros cinéticos brindados por el sistema CASA en la evaluación de semen bovino criopreservado y la fertilidad in vivo en vacas de cría sometidas a protocolos de IATF.

Evaluar si los resultados bajos de preñez a la IATF en vacas de cría están relacionados a los parámetros de cinética espermática.

Intentar desarrollar una ecuación con parámetros de cinética espermática que permita predecir fertilidad, logrando desarrollar a partir de la misma un indicador.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se contrastaron los resultados de análisis seminales realizados mediante el sistema CASA, con los resultados de fertilidad obtenidos in-vivo en protocolos de IATF con vacas de cría. Los datos que se utilizaron para esta investigación provienen de programas de IATF realizados en un mismo predio en el correr de 6 años. Nuestro trabajo incluyó la recopilación de la información de 5 años previos, y la participación (junto al equipo veterinario encargado) en la IATF del último año, así como también en los análisis seminales correspondientes.

En cuanto al semen utilizado en los protocolos, se destaca que el mismo provino de centros de toros, y fue distribuido criopreservado en termos de nitrógeno líquido. Las partidas de semen utilizadas fueron recibidas y analizadas previo al

inicio de las inseminaciones de cada año, las cuales fueron realizadas en primavera.

El total de partidas de semen utilizadas y analizadas suman 39, y provienen de 20 toros diferentes (9 de ellos de la raza Polled Hereford y 11 de la raza Aberdeen Angus), con los cuales se sirvieron en promedio 400 vacas/toro, con un máximo de 724 vacas/toro y un mínimo de 43 vacas/toro.

El análisis seminal se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal “Alfredo Ferraris”, en la estación experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), Paysandú, Uruguay. Para el mismo se utilizó el Sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), siendo un equipo AndroVision® Minitüb GmbH, Tiefenbach (Alemania), seteado para bovinos (inmóviles: BCF<3; motiles locales: VCL<25 $\mu\text{m/s}$; considerando progresivos a la suma de circulares, lentos y rápidos; circulares: radio >10<50, lentos: VCL<35 $\mu\text{m/s}$ y rápidos: VCL>35 $\mu\text{m/s}$).

En cuanto al procedimiento del análisis seminal, primero se procedió a la descongelación de las muestras de semen a baño maría, la temperatura utilizada fue 37°C durante 40 segundos. Para cada partida analizada se descongelaron dos pajuelas, las cuales se homogeneizaron formando un pool. Posterior a la homogeneización del pool se tomó una alícuota de 3 μL , que fue colocada en la cámara de conteo Makler (profundidad 10 μL). Utilizando un microscopio óptico con platina térmica a 37°C, se evaluaron mediante el sistema CASA cuatro campos, captando en total 400 o más espermatozoides. El sistema CASA de manera automática brinda parámetros tales como concentración (CONC), motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), motilidad progresiva rápida (MPR, %), motilidad progresiva lenta (MPL, %), motilidad circular (MC, %), VCL ([$\mu\text{m/s}$]), VSL ([$\mu\text{m/s}$]), VAP ([$\mu\text{m/s}$]), DCL ([μm])DSL ([μm]), DAP ([μm]), ALH ([μm]), BCF ([Hz]), HAC ([rad]), WOB (VAP/VCL), LIN (VSL/VCL), STR (VSL/VAP).

Se consideraron aptas aquellas muestras que a la descongelación tuvieron un mínimo de 35% de motilidad progresiva y al menos 6 millones de espermatozoides progresivos (en acuerdo con la Resolución GMC N° 46/996) (Grupo Mercado Común, 1996). Todas las muestras analizadas resultaron aptas.

En cuanto al trabajo de campo, este se realizó en un predio comercial ubicado en el departamento de Paysandú, en el paraje Rincón de Pérez. En el establecimiento se trabaja con la cruce de animales Hereford y Aberdeen Angus, buscando potenciar el vigor híbrido de la cruce de dos razas carniceras. El ganado de cría está conformado por unas 3000 vacas y 500 vaquillonas aproximadamente. El manejo alimenticio se realiza sobre campo natural principalmente y también mediante el ingreso a verdeos (rye grass y avena), sobre todo en el primer mes post parto. Los servicios se realizan en invierno y en primavera mediante inseminación artificial y monta natural. En invierno se sirven las vaquillonas con 18 meses de edad y en primavera las vacas con cría

al pie. Para esta investigación solo se tendrán en cuenta los servicios de primavera realizados mediante IATF en vacas con cría al pie.

En cuanto al manejo sanitario-reproductivo, se debe destacar que el mismo es planificado y realizado por el equipo veterinario responsable del predio, que estuvieron presentes en los 6 años de investigación. Anualmente se vacuna contra Campylobacteriosis y Leptospirosis. La primovacunación se realiza en las vaquillonas, las cuales reciben vacunación y revacunación previo al servicio, luego se continúa con una revacunación anual previo al servicio de las vacas de cría. Desde el año 2017 todo el rodeo de cría se inmuniza preventivamente contra brucelosis. La primovacunación se realiza en terneras mayores a 6 meses, y revacunadas previo al servicio. Por otro lado, los toros son vacunados y revacunados contra campylobacteriosis y leptospirosis previo al servicio con doble dosis.

Con un mínimo de 50-60 días post parto, se realiza examen ginecológico pre servicio, mediante palpación rectal a todo el rodeo. Al momento de este examen se toma en cuenta: días posparto, condición corporal, estructuras ováricas presentes y estado del útero, y se clasifican en: ciclando (C), anestro superficial (AS) y anestro profundo (AP). Las vacas que se encuentran ciclando y en AS al momento del examen son las que participarán posteriormente de las IATF, mientras que las vacas detectadas en AP, son excluidas de los protocolos y se sirven mediante monta natural. Estas últimas no se tendrán en cuenta en nuestra investigación.

En cuanto a los protocolos de IATF utilizados a lo largo de estos años, debemos recalcar que hubo un cambio de los mismos en el 2021, debido a la prohibición del uso de sales de estradiol. A partir de este momento se sustituyó el uso de estradiol por GnRH. Los protocolos utilizados se especifican la figura 5.

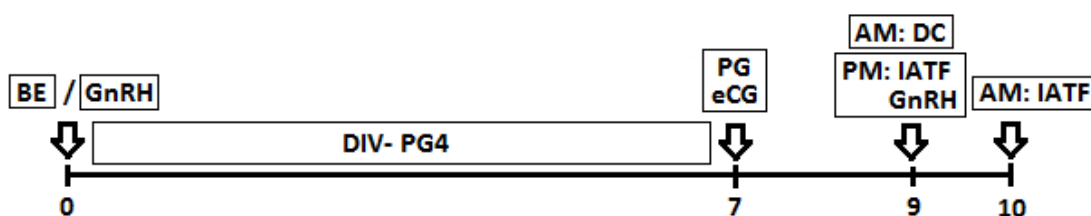


Figura 5: Protocolos utilizados en las vacas a lo largo del experimento.

La única diferencia en los protocolos utilizados, como ya se mencionó, es la sustitución del benzoato de estradiol (BE) (2mg) del día 0 por hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (100 ug gonadorelina acetato). En ese mismo momento (día 0), también se colocan los dispositivos intravaginales de progesterona (DIV-PG4) (0,5 g). Y adicionalmente se realiza destete temporario mediante la colocación de tablillas en los terneros hasta el día de la IATF.

El día 7 del protocolo se retiran los dispositivos de progesterona y se administra prostaglandina (PG) (0,150 mg) a todo el lote y gonadotropina coriónica equina (eCG) (400 UI) a aquellas hembras halladas en anestro superficial al momento del examen ginecológico.

A las 36 horas del retiro de los dispositivos se realiza detección de celos (DC) y mediante el régimen AM/PM se inseminan 12 horas más tarde aquellas que demuestran celo. Las vacas que no demuestran celo reciben una dosis de GnRH (100 ug gonadorelina acetato) a las 48 hs del retiro de los dispositivos con el objetivo de lograr la inducción de la ovulación y 12 horas más tarde son inseminadas a tiempo fijo.

A los 40/45 días de la IATF se realiza un primer diagnóstico de gestación, donde se constatan los resultados de la misma, posteriormente en marzo se vuelve a realizar un segundo diagnóstico de gestación a todo el ganado, el mismo es realizado 60 días después del retiro de los toros utilizados para el repaso.

Los datos que se recopilaron y utilizaron en la investigación incluyen: trazabilidad individual de cada vaca, estado reproductivo al momento del examen ginecológico, detección o no de celo durante el protocolo, momento de la inseminación, inseminador, toro utilizado y resultado al diagnóstico de gestación por ecografía. El establecimiento y el equipo veterinario responsable cuenta con un programa computarizado que contiene todos estos datos que requerimos para nuestro trabajo, lo que permite recabar información de varios años pasados con una gran precisión y confiabilidad.

Los datos recopilados fueron organizados en una única planilla excel, donde a cada reproductor utilizado se le adjudicó la información de: partida de semen (batch), año de utilización, fecha de análisis seminal, resultado del análisis seminal (CON, MT, MP, MPR, MPL, MC, NTE, VCL, VSL, VAP, DCL, DSL, DAP, ALH, BCF, HAC, WOB, LIN, STR) y resultado de preñez (preñez general y preñez diferencial para vacas que mostraron celo y para las que no lo hicieron). Además, se calculó para cada muestra seminal el valor del número total de espermatozoides progresivos por dosis [NTE, x10], el cual resulta de la multiplicación del volumen de la dosis, su motilidad progresiva y la concentración. Posteriormente, se añadió el resultado de la multiplicación de la MC, MPR y MPL con la variable CON para cada muestra seminal.

Posterior a la realización de la planilla Excel, se procedió a graficar los valores de los diferentes parámetros de la evaluación seminal, con el resultado de preñez general, con el fin de comprobar que podría existir algún tipo de relación entre las variables y que estas se comporten de manera lineal. Al observar estas gráficas, se encontró que en una partida de semen el dato de concentración espermática y número total de espermatozoides se alejaban enormemente del resto de las partidas, por lo que se asoció a un valor errático en el registro de

datos y fueron retirados del ensayo, esto explica porque el n de estas dos variables es de 38.

Mediante la utilización del software estadístico Statistical Analysis System (SAS) se realizó un análisis descriptivo y un análisis de normalidad, con Proc Univariate. Con Proc corr (Pearson) se evaluó la correlación entre los parámetros de cinética espermática y preñez, así como también la correlación entre los diferentes parámetros calculados y los resultados de preñez de dichas muestras. El grado de relación entre las variables según el valor del coeficiente de determinación (r) fue clasificado según lo expuesto por Hernández et al. (2014), donde un valor de r mayor 0,10 es muy débil, mayor a 0,25 es débil, mayor a 0,50 es medio, mayor a 0,75 es considerable, mayor a 0,90 es muy fuerte e igual a 1 es perfecto. Una vez realizado el análisis de correlación, con las variables de cinética espermática que resultaron significativas, se separaron los toros en dos subpoblaciones según la mediana, en alta y baja fertilidad, y se las comparó mediante un análisis de ANOVA mediante el test de Tukey (Proc Glimmix). Los protocolos de sincronización utilizados no se incluyeron en el modelo debido a que fueron testeados y no se encontraron diferencias entre ellos. Se consideró que existen diferencias significativas cuando el valor de alfa (P valor) es menor a 0,05 y entre 0,05 y 0,10 se consideró tendencia

11. RESULTADOS

Los datos recopilados para nuestro trabajo provienen de 6 protocolos de IATF, realizados en la primavera de 6 años corridos (2017-2022). Durante este período, se sirvieron mediante inseminación artificial un total de 8179 vacas. La media de vientres inseminados por año fue de 1363, con un desvío estándar de 465. Para servir estas vacas, se analizaron y utilizaron un total de 39 partidas de semen, provenientes de 20 toros distintos. El máximo de toros utilizados por año fue 7 y el mínimo fue 3.

La media de preñez general a la IATF durante el ensayo fue de $65 \pm 8,2\%$, la cual está presentada en la Tabla 1. En dicha tabla también se muestran los valores de media, mediana y desvío estándar de los resultados de preñez, variables del análisis de cinética espermática y del producto de la multiplicación de CONC con las variables de MC, MPR y MPL.

Tabla 1. Representación de media, mediana y desvío estándar de los resultados de preñez, variables de cinética espermática del CASA y variables calculadas en base a estos.

Variable	Media	Median	Desvío estándar	n
PREÑ GRAL (%)	65,01	64,91	8,19	39
PREÑ GnRH (%)	64,61	64,91	0,34	39
PREÑ CELO (%)	66,45	69,57	23,89	27
CONC (10⁶/ml)	118,72	120,63	30,56	38
MT (%)	81,19	82,61	8,40	39
MP (%)	76,92	77,26	9,19	39
MPR (%)	67,29	69,01	11,25	39
MPL (%)	7,45	5,75	5,37	39
MC (%)	2,18	2,08	1,37	39
VCL (µm/s)	147,48	152,34	28,40	39
VSL (µm/s)	60,30	60,98	10,90	39
VAP (µm/s)	73,57	75,70	13,27	39
DCL (µm)	46,46	47,74	5,57	39
DSL (µm)	17,11	17,05	2,25	39
DAP (µm)	22,04	22,12	2,55	39
ALH (µm)	1,60	1,64	0,30	39
BCF (Hz)	14,53	14,46	2,13	39
HAC (rad)	0,40	0,39	0,08	39
WOB (VAP/VCL)	0,5	0,50	0,02	39
LIN (VSL/VCL)	0,41	0,40	0,03	39
STR (VSL/VAP)	0,82	0,82	0,03	39
NTE (10⁶)	29,22	28,58	8,12	38
MPR x CONC (10⁶/ml)	81,13	76,72	25,88	38
MPL x CONC (10⁶/ml)	9,09	6,33	10,48	38
MC x CONC (10⁶/ml)	2,64	2,58	1,62	38

PREÑ GRAL: preñez general, PREÑ GnRH: Preñez de vacas que no demostraron celo y por tanto recibieron una dosis de GnRH, PREÑ CELO: preñez de vacas que demostraron celo, CONC: concentración, MT: motilidad total, MP: motilidad progresiva, MPR: motilidad progresiva rápida, MPL: motilidad progresiva lenta, MC: motilidad circular, VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad rectilínea, VAP: velocidad promedio de la trayectoria, DCL distancia en línea curva, DSL: distancia en línea recta, DAP: distancia en camino promedio, ALH amplitud lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido, HAC: actividad de la cabeza, WOB: oscilación, LIN: linealidad, STR: rectilinearidad, NTE: número total de espermatozoides.

Tabla 2. Resultados del análisis de correlación entre preñez general, preñez con GnRH y preñez de vacas que demostraron celo, y las diferentes variables seminales evaluadas mediante el sistema CASA.

Parámetro	Preñez General		Preñez GnRH		Preñez Celo	
	R	p valor	R	p valor	R	p valor
CONC (10^6 /ml)	0,34	0,04	0,26	0,11	0,64	0,0003
MT (%)	0,19	0,24	0,20	0,23	0,36	0,06
MP (%)	0,17	0,29	0,19	0,25	0,25	0,21
MPR (%)	0,12	0,48	0,15	0,37	0,04	0,83
MPL (%)	0,02	0,89	-0,01	0,97	0,31	0,12
MC (%)	0,10	0,54	0,08	0,63	0,17	0,40
VCL (μ m/s)	0,25	0,13	0,24	0,14	0,25	0,20
VSL (μ m/s)	0,30	0,06	0,31	0,06	0,24	0,23
VAP (μ m/s)	0,25	0,13	0,24	0,14	0,26	0,19
DCL (μ m)	0,14	0,41	0,17	0,31	-0,09	0,68
DSL (μ m)	0,20	0,22	0,26	0,11	-0,15	0,45
DAP (μ m)	0,15	0,35	0,19	0,24	-0,09	0,66
ALH (μ m)	-0,02	0,89	-0,005	0,98	0,05	0,82
BCF (Hz)	0,50	0,001	0,50	0,001	0,23	0,25
HAC (rad)	0,33	0,04	0,31	0,06	0,37	0,06
WOB (VAP/VCL)	-0,09	0,59	-0,09	0,60	0,05	0,79
LIN (VSL/VCL)	0,14	0,41	0,16	0,33	0,08	0,69
STR (VSL/VAP)	0,29	0,07	0,33	0,04	-0,04	0,84
NTE (10^6)	0,33	0,04	0,26	0,12	0,65	0,0002
MPR x CONC (10^6 /ml)	0,35	0,03	0,31	0,06	0,51	0,007
MPL x CONC (10^6 /ml)	0,05	0,79	0,001	0,99	0,34	0,09
MC x CONC (10^6 /ml)	0,23	0,17	0,19	0,24	0,35	0,07

PREÑ GRAL: preñez general, PREÑ GnRH: Preñez de vacas que no demostraron celo y por tanto recibieron una dosis de GnRH, PREÑ CELO: preñez de vacas que demostraron celo, CONC: concentración, MT: motilidad total, MP: motilidad progresiva, MPR: motilidad progresiva rápida, MPL: motilidad progresiva lenta, MC: motilidad circular, VCL: velocidad curvilínea, VSL: velocidad rectilínea, VAP: velocidad promedio de la trayectoria, DCL distancia en línea curva, DSL: distancia en línea recta, DAP: distancia en camino promedio, ALH amplitud lateral de la cabeza, BCF: frecuencia de batido, HAC: actividad de la cabeza, WOB: oscilación, LIN: linealidad, STR: rectilinearidad, NTE: número total de espermatozoides.

Mediante el análisis de correlación, se encontró que la CONC y el NTE, tuvieron una correlación débil pero significativa con la preñez general. A su vez, cuando se relacionó estos dos parámetros con la preñez obtenida en vacas que demostraron celo, la correlación hallada fue media y muy significativa. Sin embargo, en aquellas vacas que no demostraron celo y por tanto recibieron una

dosis de GnRH previa a la IA, no se encontró una correlación significativa (Tabla 2).

En cuanto a la motilidad total y el porcentaje de preñez de vacas que demostraron celo previo a la IA, se encontró en el análisis una tendencia, con un coeficiente de determinación que demuestra un nivel de correlación débil. Sin embargo, no se encontró tendencia ni correlación significativa entre la motilidad total y la preñez general, así como tampoco con la preñez de vacas que recibieron GnRH (Tabla 2).

El parámetro VSL mostró una tendencia, con un coeficiente de determinación que representa un nivel de correlación débil con la preñez general y con la preñez en vacas con una dosis de GnRH previo a la IA (Tabla 2).

Por su parte, el BCF obtuvo correlaciones de nivel medio con la preñez general y con la preñez con GnRH, ambas fueron muy significativas. Esto no sucedió con la preñez de vacas que demostraron celo, donde no se encontró una correlación significativa (Tabla 2).

El HAC y la preñez general presentaron una correlación significativa de nivel débil, mientras que para la preñez con GnRH y la preñez de vacas que demostraron celo se encontraron tendencias, ambas muy cercanas al límite de confianza que las establece como correlaciones significativas y ambas también con coeficientes de determinación que representan niveles de correlación débiles (Tabla 2).

El STR obtuvo una correlación significativa de nivel débil con la preñez con GnRH, mientras que entre el mismo y la preñez general se halló una tendencia, con un coeficiente de determinación que demuestra un nivel de correlación débil (Tabla 2).

En un intento de combinar parámetros, se realizó la multiplicación de parámetros de motilidad, tales como MPR, MPL y MC, con la concentración. Mediante su análisis estadístico se intentó establecer correlaciones entre estas combinaciones y la preñez general, preñez con GnRH y preñez de vacas en celo. Al combinar la MPR con la concentración se obtuvo una correlación significativa, de grado débil con la preñez general y de grado medio con preñez de vacas que demostraron celo. Por otro lado, en aquellas vacas que no demostraron celo el nivel de correlación hallado no fue significativo, pero sí alcanzo un nivel de tendencia (Tabla 2). La multiplicación de la concentración con la MC y la MPL no pudo establecer correlaciones significativas con ninguna de las preñeces, sin embargo, la MC x CONC. demostró una tendencia con la preñez de vacas que demostraron celo (Tabla 2).

Tabla 3: Comparación entre parámetros de cinética espermática y resultados de preñez bajos (< 64,9 %) y altos (≥ 64,9 %) en los protocolos de IATF.

Parámetro	Preñez Alta	Preñez Baja	EEM	p-valor
CONC (10⁶/ml)	127,52	110,80	6,83	0,09
NTE (10⁶)	31,35	27,30	1,83	0,13
VSL (µm/s)	63,35	57,40	2,40	0,09
BCF (Hz)	15,63	13,48	0,42	0,001
HAC (rad)	0,42	0,37	0,02	0,07
STR (VSL/VAP)	0,83	0,81	0,006	0,06

CONC: Concentración de espermatozoides, NTE: Número total de espermatozoides, VSL: Velocidad lineal, BCF: Frecuencia de batido, HAC: Actividad de la cabeza, STR: Rectilinearidad

Mediante el análisis de ANOVA (Tabla 3), se pudo establecer que, aunque en términos absolutos el grupo de “preñez alta” obtuvo resultados superiores de todos los parámetros evaluados, solo el BCF logró establecer diferencias significativas entre grupos. En cuanto a CONC, VSL, HAC y STR, se puede decir que, aunque los mismos no lograron alcanzar diferencias significativas, sí tendieron a ser mayores cuando la preñez fue alta que cuando fue baja (Tabla 3).

12. DISCUSIÓN

Establecer la relación existente entre la calidad del semen in vitro y la fertilidad alcanzada a nivel de campo ha sido objeto de un número importante de investigaciones (Amann, 1989; Farrell et al., 1998; Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000; Rodríguez-Martínez, 2003; Sudano et al., 2011; Zhang et al., 1999). Se entiende que la mejor manera de estimar la fertilidad de un determinado reproductor sigue siendo hasta la fecha la prueba de fertilidad a campo, la cual requiere tiempo y el control de otras fuentes de variación (de la hembra, del ambiente, etc.), además es costosa (Zhang et al., 1999; Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000). En la fertilidad potencial de una partida de semen criopreservado se involucran, además de la fertilidad potencial del reproductor, aspectos de la calidad de la dosis de semen a utilizar, y a éstos últimos se dedica esta tesis.

Dada la creciente incorporación e importancia de los programas de IATF en la producción bovina mundial, sería un gran beneficio lograr que un análisis seminal in vitro lograra predecir la fertilidad potencial de un toro (Ward et al., 2001). En este sentido, los sistemas CASA y especialmente los parámetros cinéticos que brinda, tienen el potencial de predecir de forma más precisa la fertilidad que las evaluaciones seminales clásicas (Broekhuijse et al., 2012; Christensen et al., 1999; den Daas, 1992). Varios autores lograron establecer correlaciones significativas entre dichos parámetros y la tasa de fertilidad lograda (Farrell et al.,

1998; Nagy et al., 2015), sin embargo, existe cierta controversia a la hora de establecer cuáles son los parámetros que realmente son capaces de predecir la fertilidad potencial. Los motivos de estas diferencias, creemos que pueden ser tan diversos como la utilización de diferentes sistemas CASA, tamaños de muestras insuficientes, utilización de toros con poca variabilidad en sus evaluaciones seminales y la propia complejidad del proceso de la fertilización.

Nuestro trabajo cuenta con algunas ventajas, tales como su realización en un mismo predio, un buen número de animales involucrados (8179 vacas y 20 toros) y un mismo equipo veterinario responsable del manejo reproductivo del rodeo. Consideramos este último punto muy importante, ya que gracias a esto se logró disminuir la variabilidad de los datos de fertilidad recabados. El equipo veterinario año a año se encargó de planificar los protocolos, enviar las muestras de semen a analizar al laboratorio, clasificar el rodeo, inyectar las hormonas necesarias, descongelar el semen, inseminar, diagnosticar las preñeces mediante ecografía, y posteriormente ingresar todos los datos recabados a un programa informático propio. Además, el análisis seminal de todas las partidas de semen utilizadas, se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la estación experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), lo que brinda confiabilidad, repetibilidad y capacidad de comparación de los resultados obtenidos, ya que el semen fue procesado en un mismo sistema CASA y manejado por personal con formación y experiencia.

La media de la preñez lograda en estos 6 años de trabajo fue de $65 \pm 8,2\%$, esto se encuentra por encima de lo reportado por otros autores, por ejemplo, Menchaca (2013) y Bó (2018) reportan promedios de preñez, mediante el uso de protocolos de IATF, que oscilan entre 50 a 60%. Estos resultados de preñez a la IATF de nuestro trabajo, reflejan el control de los factores de variación inherentes al animal, de manejo y climáticos, así como también una buena calidad del semen utilizado.

En base a los resultados obtenidos en el análisis estadístico, como ya se expuso, se hallaron correlaciones y tendencias entre la tasa de preñez y algunos parámetros de cinética espermática. Al igual que las investigaciones de Farrell et al. (1998), Verstegen et al. (2002) y Oliveira et al. (2013), en este trabajo se demuestra y confirma la importancia de la evaluación de la motilidad espermática, especialmente si la misma es realizada con sistemas computarizados tales como el CASA, que permiten una evaluación objetiva y repetible.

En este caso, los parámetros que individualmente demostraron estar correlacionados de manera significativa con la preñez fueron CONC, NTE, BCF, STR y HAC. Sin embargo, los valores de los coeficientes de determinación (r^2) de estos parámetros fueron clasificados de medios a débiles. El parámetro que demostró tener un mayor valor de correlación fue el BCF, con un r^2 de 0.50. Esto

podría explicarse analizando el trabajo de Hidalgo (2021), donde se estableció que los toros de mayor fertilidad poseían un mayor número de espermatozoides pertenecientes a una sub población clasificada como “espermatozoides rápidos y no lineales”, los cuales contaban con alta amplitud y latido flagelar asimétrico, que les permitía penetrar en la zona pelúcida. Además, otros estudios como Murase et al. (2010), Shojaei et al. (2012) y Van Der Horst (2014) también concluyen que estos espermatozoides con patrón celular hiperactivado, se encuentran en mayor proporción en eyaculados de toros de mayor fertilidad. Por otro lado, otros autores encontraron que las correlaciones significativas, con valores más elevados, pertenecen a parámetros de velocidad media. Un ejemplo de esto es el trabajo de Amann (1989), donde mediante la utilización de semen criopreservado de un total de 9 toros, se obtuvieron 25 combinaciones posibles (de a dos toros), con las cuales se inseminaron un total de 785 vientres y posteriormente se determinó paternidad por marcadores genéticos y se establecieron correlaciones entre parámetros cinéticos y la fertilidad lograda, obteniendo correlaciones de 0.86 para MT, 0.68 para VCL y 0.70 para VSL, mientras que la correlación hallada para BCF fue de 0.16.

Las correlaciones significativas halladas entre preñez general y preñez de vacas que demostraron celo con los parámetros CONC y NTE van en concordancia con lo reportado por diferentes autores, ya que la concentración espermática es un parámetro de la evaluación seminal que ha demostrado tener una elevada correlación con la fertilidad (Gomez y Migliorisi, 2015). Sin embargo, la preñez de las vacas que no demostraron celo y recibieron una dosis de GnRH no pudo correlacionarse con estos parámetros. Creemos que esto se explica debido a que siempre en los protocolos de IATF existe un porcentaje de animales que no logran responder al tratamiento y pertenecen al grupo de vacas que no demuestran celo. Este porcentaje varía en función del lote con el que estemos trabajando, en este caso, como ya se mencionó, las vacas seleccionadas para la IATF fueron previamente clasificadas por su ciclicidad, reduciendo así en gran medida el número de vacas incapaces de responder al estímulo hormonal. También en este grupo, se encuentran vacas que, debido a la variabilidad propia de la función biológica, logran responder al estímulo, pero lo hacen en tiempos diferentes a la mayoría, ocurriendo ovulaciones muy tempranas o muy tardías, a las cuales se les dificulta lograr una gestación. Para ambos casos expuestos anteriormente, la modificación de parámetros espermáticos tales como CONC y NTE, no influye en los resultados.

Los parámetros BCF y STR han sido reportados y correlacionados con la fertilidad en diferentes trabajos (Amann,1989; Gillan et al., 2008 y Oliveira et al. 2013). En algunos de ellos, los valores obtenidos para estos dos parámetros son similares a los de nuestro trabajo, tal es el caso del trabajo de Amann (1989), donde se obtuvo una media de 15,9 para la variable BCF, mientras que en nuestro trabajo se encontró una media de 14,53. Por su parte Gillan et al. (2008),

reportan una media de 0,80 para la variable STR, mientras que, en este trabajo la media hallada fue de 0.82. El hecho de que diferentes trabajos logren correlacionar estos mismos parámetros con fertilidad, utilizando muestras seminales con medias similares, le aporta a nuestros resultados confiabilidad y repetibilidad. Es razonable que estos parámetros resulten significativos, si pensamos que estos parámetros son considerados como medidas que reflejan el vigor (BCF) y la progresividad (STR) de los espermatozoides, siendo estas, cualidades que, tradicionalmente han sido calificadas como uno de los tantos requisitos que los espermatozoides deben de cumplir para lograr la fertilización.

En el trabajo de Oliveira et al. (2013), utilizando semen criopreservado, se logró correlacionar la fertilidad con algunos parámetros cinéticos tales como MT, MP y BCF. Lo relevante de esta investigación fue que el BCF sólo pudo ser correlacionado con la fertilidad tras dos horas de incubación térmica previa. Aunque en nuestro trabajo los parámetros de cinética espermática sólo fueron medidos luego de la descongelación de la muestra seminal, podemos resaltar que, el BCF demostró tener una correlación significativa sólo con la preñez de aquellas vacas que no demostraron celo antes de ser servidas. Esto podría tener relación con los resultados obtenidos por Oliveira et al. (2013) y podría explicarse por la dispersión de la ovulación del grupo de vacas que no demuestran celo, de todos modos, creemos que el tema requiere de una investigación más profunda. La media del BCF tras dos horas de incubación en el trabajo de Oliveira et al. (2013) fue de $22,4 \pm 5,1$, mientras que la media del BCF inmediatamente post descongelación de nuestro trabajo fue de $14.53 \pm 2,13$. Los diferentes momentos en que se determinó el parámetro no permiten la correcta comparación de sus medias.

En una investigación realizada por Gillian et al. (2008) se hallaron correlaciones muy interesantes entre la combinación de diferentes pruebas seminales in-vitro (incluyendo el sistema CASA) y la fertilidad, alcanzando valores de r que oscilaron entre 0.92 y 1.0. Estas correlaciones les permitieron establecer que muestras con valores elevados de BCF se relacionaron con la presencia de problemas en la integridad de la cromatina de los espermatozoides presentes, del mismo modo establecieron que aquellas muestras con menor número de espermatozoides con morfología anormal, se relacionaban con espermatozoides con mayor velocidad (VAP y VSL) (Gillian et al., 2008). Las velocidades promedio, en nuestro caso, no lograron correlaciones significativas con la preñez. El único parámetro de velocidad media que logró demostrar una tendencia fue el VSL. En el mismo trabajo de Gillian et al. (2008), se concluyó que la fertilidad superior de algunos toros puede ser explicada, entre otras cosas, por su VSL más que por otros parámetros de velocidad media, ya que se especula que este parámetro tiene un papel fundamental en el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra y en la posterior penetración del ovocito. La media de VSL hallada en ese trabajo fue de $65,9 \pm 0,7$,

mientras que en el presente estudio la media obtenida fue de $60,3 \pm 10,9$. Los valores hallados son similares, aunque en nuestro trabajo el desvío estándar fue superior. No debemos olvidar que el uso de sistemas CASA de diferente origen y configuración puede generar variaciones en los resultados que dificultan su comparación. Por su parte, Nagy et al. (2015), demostraron correlaciones significativas para las 3 velocidades promedio, y recomiendan la utilización del valor de VAP como predictor de la fertilidad potencial de una muestra seminal antes que VSL, ya que muestras con desplazamientos diferentes podrían tener un mismo valor de VSL.

Si bien en este trabajo, se pudo correlacionar significativamente el HAC con los resultados de preñez, no se encontraron reportes de otras investigaciones que demuestren la existencia de esta correlación. Esto puede deberse a que, generalmente, este parámetro no se incluye en las evaluaciones por estos sistemas, por lo que, en muchos de los trabajos realizados, el mismo no es una variable evaluada.

Según lo reportado por varios autores (Farrell et al., 1998; Gillian et al., 2008; Oliveira et al., 2013;), el grado de correlación de los parámetros cinéticos con la fertilidad, puede ser mejorado mediante la combinación de los mismos, por ejemplo, en el trabajo de Farrell et al. (1998) se encontró una correlación débil entre la MT y la fertilidad ($r^2 = 0.34$), sin embargo, al realizar combinaciones tales como MP, ALH y BCF o ALH, BCF y VSL se obtuvieron valores de r de 0.83 y 0.89 respectivamente. Debido a lo expuesto anteriormente, se cree que los coeficientes de determinación hallados en este trabajo podrían elevarse mediante su combinación, logrando así una herramienta de predicción de fertilidad más confiable. Al intentar comprobar esto, se realizó la combinación de la CONC con alguno de los parámetros de cinética espermática (ver tabla 2), hallando una correlación significativa de la combinación CONCxMPR con preñez general y con aquellas que demostraron celo.

En particular para esta investigación, los resultados presentan una variabilidad y dispersión menor a la esperada, lo que representa una desventaja a la hora del análisis de datos. Por lo que consideramos que la inclusión dentro de la investigación de muestras de semen que se encuentren sobre el límite entre una muestra apta y una no apta, nos brindaría una mayor variabilidad en los resultados, los cuales podrían ser analizados de mejor manera.

Al analizar los resultados obtenidos mediante el análisis de ANOVA (Tabla 3) de los parámetros más relevantes de este trabajo (CONC, NTE, VSL, BCF, HAC y STR), podemos concluir que los toros agrupados en el grupo “preñez alta”, presentan valores absolutos superiores que los toros pertenecientes al grupo de “preñez baja”. Sin embargo, sólo el BCF logró diferenciarse significativamente entre ambos grupos. Otros tales como CONC, VSL, HAC y STR, si bien no lograron diferenciarse significativamente, se encontraron dentro de los límites

establecidos como tendencias. Estos resultados pueden explicarse debido a los resultados de preñez logrados en nuestro trabajo. Como ya se mencionó, la inclusión de dosis de IA 100% aptos, sumado a un buen manejo reproductivo del rodeo, hizo que los resultados de preñez fueran superiores a los promedios reportados. Los grupos “preñez alta” y “preñez baja” fueron discriminados según una media de preñez elevada (64,9%), haciendo que el grupo de “preñez baja” oscile entre resultados que van desde 48,84% a 64.48%, mientras que el grupo de “preñez alta” varió entre 64.91% y 85.14%. Otros autores tales como Hidalgo et al. (2021), al agrupar y comparar grupos similares de alta y baja preñez lograda, lograron obtener diferencias significativas entre grupos para otros parámetros tales como motilidad total y motilidad progresiva.

Por último, hay que remarcar que, si bien las fuentes de variabilidad fueron en gran parte reducidas por el propio manejo del establecimiento, por tratarse de un sistema extensivo y una investigación que involucra varios años, el clima interanual debe ser considerado como un importante factor de variación ambiental, que muchas veces es determinante. Los cambios en las normativas vigentes determinaron la prohibición del uso de sales de estradiol, lo que no permitió la utilización de un mismo protocolo de IATF a través de los años y representó una fuente de variación inevitable. A pesar de estas consideraciones, por los motivos mencionados anteriormente, los datos recopilados y analizados en este trabajo presentan una gran confiabilidad y calidad, por lo que los resultados encontrados deben ser considerados de igual manera.

13. CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos y a la información recabada, podemos concluir que parámetros de cinética espermática que brinda el sistema CASA tales como CONC, NTE, BCF, STR y HAC, se correlacionaron significativamente con la fertilidad in vivo y por tanto podrían ser utilizados como potenciales predictores de fertilidad en protocolos de IATF a campo. Debido a las diferencias halladas entre este y otros trabajos similares a la hora de establecer cuáles son los parámetros con mejor capacidad de predicción de la fertilidad, creemos que es necesario seguir investigando el tema para llegar a resultados más concluyentes. Del mismo modo, la combinación de parámetros ha demostrado ser un buen mecanismo para incrementar el grado de correlación de las variables con la fertilidad. Si bien en nuestro trabajo se hizo un intento básico de lo mismo, la combinación de la CONC con la MPR demostró estar correlacionada significativamente con la fertilidad. Las variables integradas en esta tesis demuestran lo que sugieren otros autores, por lo que la integración de parámetros en una función matemática podría resultar en una herramienta de predicción más precisa de la fertilidad.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A., & Said, T. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, 9(4), 331-345.
- Álvarez-Lledó, C. (2003). *Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del sperm class Analyzer* (Tesis de grado). Universidad de Valencia, España.
- Amann, R. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology*, 2(10), 89-98.
- Amann, R. (2005). Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. *Theriogenology*, 63, 698-715.
- Amann, R., & Hammerstedt, R. (1993). In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology*, 14, 397-406.
- Amann, R., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17.
- Antognazza, M., Cresci, S., & Ferreira A. (2007). *Evaluación del manejo reproductivo en rodeos de cría en condiciones pastoriles en Uruguay* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Anzar, M., Hassan, M., Graham, E., Deyo, R., & Singh, G. (1991). Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*, 2(36), 307-317.
- Ball, P., & Peters, A. (2004). *Reproduction in cattle* (3^a ed.). Oxford: Blackwell.
- Bardier Chifflet, R. (2020). *Uso de la IATF como herramienta para mejorar la rentabilidad en establecimientos de cría en Uruguay* (Trabajo final de grado). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Escuela para Graduados, Instituto de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina.
- Barth, A. (2018). Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. *Animal*, 12(1), 158-164.
- Barth, A., & Oko, R.J. (1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa: Iowa State University Press.
- Beggs, D., Bertram, J., Chenoweth, P., Entwistle, K., Fordyce, G., Johnston, H., Johnston, P., McGowan, M., Niethe, G., Norman, S., & Perry, V. (2013). *Veterinary bull breeding soundness evaluation*. Brisbane: Australian Veterinary Association.
- Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., & Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por

variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet*, 13(2), 25-38.

Bloom, E. (1977). Sperm morphology with reference to bull infertility. En *First All India Symposium on Animal Reproduction* (pp. 61-81), Ludhiana.

Bó, G. (2020). Pursuit of a means of manipulating ovarian function in the cow: an adventure of serendipity, collaboration, and friendship. *Theriogenology* 150, 480-489.

Bó, G., Adams, G., Pierson, R., & Mapletoft, R. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43, 31-40.

Bó G., & Callejas S.S. (2008). Sincronización de celos y ovulaciones en el ganado bovino. En *Biotechnología de la reproducción* (págs. 189-199). Mar del Plata: Reprobiotec.

Bó, G., Cutaia, L., & Veneranda G. (2003). Aplicación de programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en rodeos de cría manejados en condiciones pastoriles. En Centro Médico Veterinario Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XXXI., pp. 31-40). Paysandú: CMVP.

Bó, G., Cutaia, L., Chesta, P., Balla, E., Picinato, D., Peres, L., ...Baruselli, P. (2005). Implementación de Programas de Inseminación Artificial en rodeos de cría de Argentina. En *Resúmenes VI Simposio Internacional de Reproducción Animal* (pp. 97-128). Córdoba, Argentina.

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

Bó, G., Huguenine, E., de La Mata, J., Núñez-Olivera, R., Baruselli, P., & Menchaca, A. (2018). Programs for fixed-time artificial insemination in South American beef cattle. *Animal Reproduction*, 15(Suppl 1), 952-962.

Bó, G., Macagano, A., de la Mata, J., Vera Cedeño, A., Huguenine, E., Tschopp, J., & Menchaca, A. (2023) Protocolos de IATF: desde la comprensión de la dinámica folicular ovárica a las restricciones actuales y futuras de su uso. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. L, pp.123-138). Paysandú: Centro Médico Veterinario Paysandú.

Bochenek, M., Smorag, Z., & Pilch, J. (2001). Ensayo de estructura de cromatina espermática de toros calificados para inseminación artificial. *Theriogenología*, 56(4), 557-567.

- Bonavera, J., Schiersmann, G., Alberio, R., & Mestre, J. (1990). A note of the effects of 72-hour calf removal and/or bull exposure upon post-partum reproductive performance of Angus cows. *Animal Production*, 50, 202-206.
- Bolarín, A. (2016). Integridad de la cromatina nuclear espermática: Aplicaciones en el análisis de semen de verracos. *Avances en Reproducción e IA*.
https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/10702/85%20Integridad%20de%20la%20cromatina%20nuclear%20AvancTecPorc_013_0056_2016%20%20PDF.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Bratton, R., Foote, R., Henderson, C., Musgrave, S., Dunbar, R., Dunn, H., & Beardsley, J. (1956). The relative usefulness of combinations of laboratory tests for predicting the fertility of bovine semen. *Journal of Dairy Science*, 39, 1542-1549.
- Bridges, G., Helser, L., Grum, D., Mussard, M., Gasser, C., & Day, M. (2008). Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology*, 69, 843-851.
- Bridges, G., Mussard, M., Hesler, L., & Day, M. (2014). Comparison of follicular dynamics and hormone concentrations between the 7-day and 5-day CO-Synch + CIDR program in primiparous beef cows. *Theriogenology*, 81, 632-638.
- Broekhuijse, M., Sostaric, E., Feitsma, H., & Gadella, B., (2012): Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of Animal Science*, 90(3), 779-789.
- Budworth, P., Amann, R., & Chapman, P. (1988): Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *Journal of Andrology*, 9(1), 41-54.
- Butler, M. (2008). Claves para una IATF exitosa en rodeos de cría. En revista Taurus (Ed.), *Cuartas Jornadas Taurus de Reproducción Bovina* (pp. 34-47). Buenos Aires: Revista Taurus.
- Byrd, W., Bradshaw, K., Carr, B., Edman, C., Odom, J., & Ackerman, G. (1990). A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor sperm. *Fertility and Sterility*, 53(3), 521-527.
- Carnevale, E., & Ginther, O. (1995). Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biology of Reproduction*, 52, 209-214.
- Catena, M., & Cabodevilla, J. (1999). Evaluación del semen bovino congelado. *Taurus*, 1(3), 18-31.

- Cavestany, D., & Méndez, J. (1993). Manual de inseminación artificial en bovinos. Montevideo: INIA.
- Chan, S., Wang, C., Song, B., Lo, T., Leung, A., Tsoi, W., & Leung, J. (1989). Computer-assisted image analysis of sperm concentration in human semen before and after swim-up separation: comparison with assessment by haemocytometer. *International Journal of Andrology*, 12(5), 339-345.
- Chenoweth, P., & McPherson, F. (2016) Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. *Animal Reproduction Science*, 169, 32-36.
- Christensen, P., Brockhoff, P., & Lehn-Jensen, H. (1999): The relationship between semen quality and the non-return rate of bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 34(6), 503-507.
- Christensen, P., Stenvang, J.P., & Godfrey, W. (2004). A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian semen. *Journal of Andrology*, 25(2), 255-264.
- Coetzee, K., Bermes, N., Krause, W., & Menkveld, R. (2001). Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia*, 33(3), 159-163.
- Coetzee, K., Kruger, T., & Lombard, C. (1999): Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia*, 31(3), 163-168.
- Colenbrander, B., Gadella, B., & Stout, T. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 305-311.
- Cuberlo, M., & Rodríguez, Z. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Cucho, H. (2018). *Análisis de semen asistido por computadora de camélidos*. Recuperado de <https://reproduccionanimal.blog/wp-content/uploads/2020/01/m3-cucho-casa-2018-manual.pdf>
- Cutaia, L., Veneranda, G., Tríbulo, R., Baruselli, P., & Bó, G. (2003). Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en rodeos de cría: Factores que lo afectan y resultados productivos. En *Simpósio Internacional de Reproducción Animal* (Vol. V, pp. 119-132). Huerta Grande, Córdoba.
- Davis, A. P., Graham, J. K., & Foote, R. H. (1987). Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility

of fluorochrome-labeled acrosome-reacted bull spermatozoa. *Gamete Research*, 17(4), 343-354.

Day, M. L. (2018). State of the art of GnRH-based timed AI in beef cattle. *Animal Reproduction (AR)*, 12(3), 473-478.

De Castro, T., Ibarra, D., Valdez, L., Rodriguez, M., Garcia Lagos, F., Benquet, N., & Rubianes, E. (2002). *Medidas para acortar el anestro posparto en la vaca de cría*. Montevideo: Premio de la Academia Nacional de Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Montevideo.

De Jarnette, J. (2004). Impacto del toro, de la calidad seminal y del técnico inseminador sobre las tasas de concepción en rodeos lecheros. En *Memorias Segundas Jornadas Taurus de Reproducción Bovina* (pp. 54-73). Buenos Aires: Revista Taurus.

De Nava, G. D. (2011). Reproducción en los rodeos de cría pastoriles: el enfoque de un veterinario de campo. En *XV Congreso Latinoamericano de Buiatría/XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría*. Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

De Nava, G. (2015). La IATF como tecnología reproductiva en el manejo de los rodeos de cría. En *XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp. 115-126). Paysandú: Centro Médico Veterinario Paysandú.

Decuadro, H., Camus, A. & Guy, D. (2002). Assessment of bull semen characteristics by flow cytometry and their relation with non return rates: a preliminary study in France. En *14th Meeting European A.I VETS* (pp. 105-108).

Den Daas, N. J. (1992). Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science*, 28(1-4), 87-94.

Díaz, L. (2021). *Mejoramiento de los parámetros reproductivos y productivos en la finca el secreto mediante la técnica de inseminación artificial bovina*. Universidad Nacional Abierta Y A Distancia. Recuperado de <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/42104>

Dirección General de Servicios Ganaderos. (2020). Resolución DGSG N 269/020. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca>

Dirección General de Servicios Ganaderos. (2021). Resolución DGSG N 263/021. Dirección General de Servicios Ganaderos Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca>

Dirección Nacional de Sanidad Animal. (2022). Disposición 54/2022. Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-54-2022-361367/texto>

- Dobson, R., & Smith, R. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, 60, 743-752.
- Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J., Acha, D., Demyda, S., Muñoz-Serrano, A., & Hidalgo, M. (2011). Centrifugation on PureSperm (®) density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 76, 381-385.
- Dorado, J., Alcaráz, L., Duarte, N., Portero, J., Acha, D., & Hidalgo, M. (2011). Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm(®) gradient. *Animal Reproduction Science*, 125, 211-218.
- Dorado, J., Muñoz, A., & Hidalgo, M. (2010). The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science*, 121, 115-123.
- Dott, H., & Foster, G. (1979). The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *Reproduction*, 55(1), 161-166.
- Douglas-Hamilton, D. H., Smith, N. G., Kuster, C. E., Vermeiden, J. P., & Althouse, G. C. (2005). Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology*, 26(1), 115-122.
- Dunn, T., Ingalls, J., Zimmerman, D., & Wiltbank, J. (1969). Reproductive performance of 2-year old Hereford and Angus heifers as influenced by pre- and postcalving energy intake. *Journal of Animal Science* 29, 719-726.
- Dunn, T., & Kaltenbach, C. (1980) Nutrition and the postpartum interval of the ewe, sow and cow. *Journal of Animal Science*, (Suppl. II), 51, 29-39.
- Eid, L., Lorton, S., & Parrish, J. (1994). Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biology of Reproduction*, 51(6), 1232-1237.
- Enciso, M., López, C., Fernández, J., García, P., Gosálvez, A., & Gosálvez, J. (2006). A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*, 65(2), 308-316.
- Entwistle, K. (1983). Factors influencing reproduction in beef cattle in Australia. *Australian Meat Research Committee Review*, (43), 30.
- Esteso, M., Fernández, M., Soler, A., Montoro, V., Martínez, F., & Garde, J. (2009). Identification of SpermHead Morphometric Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm Samples. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 206-211.

- Evenson, D., Jost, L., Marshall, D., Zinaman, M., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., & Claussen, O. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 14(4), 1039-1049.
- Evenson, D., Larson, K., & Jost, L. (2002). Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 23(1), 25-43.
- Farrell, P., Presicce, G., Brockett, C., & Foote, R. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49(4), 871-879.
- Fernández, J., Muriel, L., Rivero, M., Goyanes, V., Vázquez, R., & Álvarez, J. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology*, 24(1), 59-66.
- Ferraz, M. A. M. M., Morató, R., Yeste, M., Arcarons, N., Pena, A. I., Tamargo, C., ... Mogas, T. (2014). Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*, 81(8), 1067-1072.
- Fetterolf, P., & Rogers, B. (1990): Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. *Molecular Reproduction and Development*, 27(4), 326-331.
- Fioretti, C. (2006). Inseminación Artificial: Una poderosa herramienta subutilizada. *Angus*, 234, 50-55.
- Fitzpatrick, L., Fordyce, G., McGowan, M., Bertram, J., Doogan, V., DeFavieri, J., Miller, R., & Holroyd, R. (2002). Bull selection and use in northern Australia: Part 2. Semen characteristics. *Animal Reproduction Science* 71, 39-49.
- Flores, R., Looper, M., Rorie, R., Hallford, D., & Rosenkrans, C. (2008). Endocrine factors and ovarian follicles are influenced by body condition and somatotropin in postpartum beef cows. *Journal of Animal Science*, 86(6), 1335-1344.
- Fréour, T., Jean, M., Mirallie, S., & Barriere, P. (2012). Computer-assisted sperm analysis parameters in young fertile sperm donors and relationship with age. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(2), 102-106.
- García Pintos, C., Cuadro, F., Núñez-Olivera, R., Brochado, C., Fabini, F., Abelenda, C., ... Menchaca, A. (2022). Alternativas al uso de estradiol en programas de IATF en bovinos de carne. En *XLIX Jornadas*

Uruguayas de Buiatria (pp. 109-121). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

- García, V., de Paz, P., Martínez, F., Álvarez, M., Gomes, S., Bernardo, J., Anel, E., & Anel, L. (2007). DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull semen. *International Journal of Andrology*, 30(2), 88-98.
- Geary, T., & Whittier, J. (1998). Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the ovsynch or co-synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist*, 4, 217-220.
- Gerris, J., & Khan, I. (1987). Correlation between in vitro fertilization and human sperm density and motility. *Journal of Andrology*, 8(1), 48-54.
- Geymonat, D. (1985). Tecnologías de manejo para el control del anestro postparto. En *Postparto en la Hembra Bovina* (pp. 65-98). Montevideo: IICA ; MGAP.
- Gil, M., García, M; Barón, F., Aparicio, I., Santos, A., & García, L. (2009). Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, 71, 254-263.
- Gil-Villa, A., Cardona, W., Agarwal, A., Sharma, R., & Cadavid, A. (2009). Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect? *Fertility and Sterility*, 92(2), 565-571.
- Gil-Villa, A., Cardona, W., Agarwal, A., Sharma, R., & Cadavid, A. (2010). Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility* 94(4), 1465-1472.
- Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W., & Evans, G. (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science* 103(3-4), 201-214.
- Gómez, V., & Migliorisi, L. (2007). *Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes*. Recuperado de https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf
- Graham, J. K. (1996). Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12(1), 131-147.
- Graham, J. K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Rcience*, 68(3-4), 239-247.
- Graham, J. K., & Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64(3), 492-504.

- Grupo Mercado Común. (1996). Resolución GMC N.º 46/996: Marco regulatorio para el tratamiento de la genética animal de bovinos caprinos ovinos équidos y porcinos en el MERCOSUR; estándares biotecnológicos mínimos para la comercialización de material seminal en el ámbito del MERCOSUR. Recuperado de <https://www.imo.com.uy/bases/decretos-internacional/165-2000>
- Günzel-Apel, A. R., Günther, C., Terhaer, P., & Bader, H. (1993). Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 47, 271-278.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Kiawah Island: McGraw-Hill Interamericana.
- Hammerstedt, R.H. (1996). Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 77-87.
- Hansen, C., Vermeiden, T., Vermeiden, J. P. W., Simmet, C., Day, B. C., & Feitsma, H. (2006). Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology*, 66(9), 2188-2194.
- Hanson, F. W., & Overstreet, J. W. (1981). The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 140(2), 173-178.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (6ª ed., pp. 102-256). México: McGraw-Hill.
- Hidalgo, C., Tamargo, C., & Díez, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Boletín informativo del SERIDA*, 2, 39-43.
- Hidalgo, M., Marqués de Almeida, A., Zito de Moraes, F., Yudi, R., Ferreira de Souza, F., Rigo, T., & Mello, M. (2021). Sperm subpopulations influence the pregnancy rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(8), 1117-1127.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., & Soler, C. (2008). Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Animal Reproduction Science*, 103(3-4), 374-378.
- Hiers, E., Barthle, C., Dahms, V., Portillo, G., Bridges, G., Rae, D., Thacher, W., & Yelich, J. (2003). Synchronization of Bos indicus x Bos Taurus cows for timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone plus prostaglandin F2α in combination with megestrol acetate. *Journal of Animal Science*, 81(4), 830-835.

- Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., Tsunoda, H., & Sato, I (2001): Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(4), 213-218.
- Ho, H., Granish, K., & Suarez, S. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca^{2+} and not cAMP. *Developmental Biology*, 250(1), 208-217.
- Holt, W., & Van Look, J. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*, 127(5), 527-535.
- Holt, W. V., O'Brien, J., & Abaigar, T. (2007). Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(6), 709-718.
- Ibănescu, I., Leiding, C., & Bollwein, H. (2018). Cluster analysis reveals seasonal variation of sperm subpopulations in extended boar semen. *Journal of Reproduction and Development*, 64(1), 33-39.
- Ibanescu, I., Siuda, M., & Bollwein, H. (2020). Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches—Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. *Animal Reproduction Science*, 215, 106329.
- Instituto Nacional de la Carne. (2022). *Serie anual, stock bovinos y ovinos por edad*. Montevideo: INAC.
- Irvine, D. S., Macleod, I. C., Templeton, A. A., Masterton, A., & Taylor, A. (1994). Andrology: A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Human Reproduction*, 9(12), 2324-2334.
- Januskauskas, A., & Zilinskas, H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika*, 17, 39.
- Juarez, J. (2009). *Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de los espermatozoides de porcinos* (Tesis de Maestría). Universidad de Murcia, Valencia, España.
- Kastelic, J. P. (2013). Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. *Animal Frontiers*, 3(4), 20-25.

- Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2008). Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 368-373.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Edwin, M. J., & Veerapandian, C. (2008). Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Animal Reproduction Science*, 104(1), 9-17.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system- a Review. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 165-172.
- Kebede A. (2018). Review on factors affecting success of artificial insemination. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 6(5), 42-49. <https://doi.org/10.20546/ijcrar.2018.605.008>
- Kjoestad, H., Ropstad, E., & Andersen Berg, K. (1993). Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 34(3), 299-303.
- Koops, W. J., Grossman, M., & Den Daas, J. H. G. (1995). A model for reproductive efficiency of dairy bulls. *Journal of Dairy Science*, 78(4), 921-928.
- Koziol, J. H., & Armstrong, C. L. (2018). *Manual for breeding soundness examination of bulls: Evaluation of Semen Quality* (2^a ed.). Society for Theriogenology.
- Krause, W. (1995). Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Human Reproduction*, 10(suppl. 1), 60-66.
- Lamond, D. (1970). Nutrient status in relation to reproduction. *Journal of Animal Science*, 30, 322.
- Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T., Bonde, J., Ernst, E., Hjollund, N., ... Giwercman, A. (2000). Danish First Pregnancy Planner Study Team. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, 15(7), 1562-1567
- Larson-Cook, K., Brannian, J., Hansen, K., Kasperson, K., Aamold, E., & Evenson, D. (2003) Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, 80(4), 895-902.

- Larsson, B., & Rodriguez-Martinez, H. (2000). Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Animal Reproduction Science*, 60, 327-336.
- Liu, D., & Baker, H. (1992). Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94(1), 71-84.
- Liu, Z., & Foote, R. (1998). Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *Journal of Dairy Science*, 81(7), 1868-1873.
- Liu, D., Garrett, C., & Baker, H. (2003). Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Human Reproduction*, 18(11), 2382-2389.
- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J., & Casper, R. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13(4), 896-900.
- López García, M., Urbano Felices, A., & Cárdenas Povedano, M. (2012). *Manual de laboratorio para el análisis del semen*. Barcelona: OmniaScience Scholar.
- Machado, E. (2022) *Resultados de los diagnósticos de gestación vacuna 2022*. En INIA Treinta y Tres (ed.), *Taller de evaluación de diagnósticos de gestación vacuna* (Vol. XX). INIA Treinta y Tres.
- Machado, E. (2023) *Resultados de los diagnósticos de gestación vacuna 2023*. En INIA Treinta y Tres (ed.), *Taller de evaluación de diagnósticos de gestación vacuna* (Vol. XXI). INIA Treinta y Tres.
- Madrid-Bury, N. (2005). ¿Es posible predecir la fertilidad en los toros? En *Manual de ganadería doble propósito* (pp. 631-635). Maracaibo: Astro Data. http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo7-s8.pdf
- Marcantonio, S. (2003). *La importancia del examen postservicio*. Recuperado de <http://www.produccionbovina.com.ar>.
- Marizancén, M., & Artunduaga L. (2017). Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 247-259.
- Maroto, A., Ramón, M., García, O., Soler, A., Fernández, M., Roldan, E., Gomendio, M., Pérez, M., & Garde, J. (2012). Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: intra-and interindividual variation. *Theriogenology*, 77(8), 1529-1539.

- Marshburn, P., McIntire, D., Carr, B., & Byrd, W. (1992). Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, 58(1), 179-186.
- Martí, J., Aparicio, I., Leal, C., & García-Herreros, M. (2012). Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. *Theriogenology*, 78(3), 528-541.
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E., Garde, J., Anel, L., & de Paz, P. (2011). Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75(5), 783-795.
- Mederos, A., Faliveni, C., & Dutra, F. (2022). Estudio sobre las pérdidas reproductivas en los rodeos de cría del norte y este del Uruguay. *Revista INIA*, 69, 20-24.
- Mekonnen, T., Bekana, M., & Abayneh, T. (2010). Reproductive performance and efficiency of artificial insemination smallholder dairy cows/heifers in and around Arsi-Negelle, Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, 22(3), 61.
- Mellisho, E. (2010). Evaluación seminal de calidad seminal. En *Manual de Laboratorio de Reproducción Animal*. Recuperado de http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/Reproduccion_archivos/Practica%204-eval-semen.pdf
- Menchaca, A., Núñez, R., de Castro, T., García Pintos, C., & Cuadro, F. (2013). Implementación de programas de IATF en rodeos de cría. *INIA Serie Técnica*, 208, 229-246.
- Menchaca, A., Núñez, R., Wijma, R., García, C., Fabini, F., & De Castro, T. (2013). Como mejorar la fertilidad de los tratamientos de IATF en vacas Bos taurus. En *Simposio Internacional de Reproducción Animal* (Vol. X, pp. 103-133). Córdoba: IRAC.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2020). *Anuario OPYPA 2020*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2020>
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2021). *Anuario OPYPA 2021*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/anuario-opypa-2021>
- Miró, J., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Medrano, A., Rigau, T., & Peñalba, A. (2009). Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in

- refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, 72(8), 1017-1022.
- Morado, S., Pereyra, V., Breining, E., Sara, R., & Cetica, P. (2015). Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 2(1), 1005-1008.
- Mortimer, D., Leslie, E., Kelly, R., & Templeton, A. (1982). Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 64(2), 391-399.
- Muiño, R. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas* (Tesis de doctorado). Facultad de veterinaria, USC, España.
- Muiño, R., Fernandez, M., Arean, H., Viana, J., Lopez, M., Fernandez, A., & Peña, A. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, 101(3), 175-191.
- Muiño, R., Rivera, M., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J., & Peña, A. (2008). Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Animal Reproduction Science*, 109(1-4), 50-64.
- Murase, T., El-Kon, I., Harayama, H., Mukoujima, K., Takasu, M., & Sakai, K. (2010). Hyperactivated motility of frozen-thawed spermatozoa from fertile and subfertile Japanese black bulls induced by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate analogue, cBiMPS. *Journal of Reproduction and Development*, 56(1), 36-40.
- Nagy, A., Polichronopoulos, T., Gáspárdy, A., Solti, L., & Cseh, S. (2015). Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer - assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(3), 370-381.
- National Association of Animal Breeders. (1986). Laboratory tests for evaluating bovine semen. En *11th Technical Conference Proceedings* (pp. 102). Madison: NAAB.
- Oliveira, L., de Arruda, R., de Andrade, A., Celeghini, E., Reeb, P., Martins, J., ... de Lima, V. (2013). Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Animal Reproduction Science*, 137(3-4), 145-155.
- Overstreet, J., Katz, D., Hanson, F., & Fonseca, J. (1979). A simple, inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertility and Sterility*, 31(2), 162-172.

- Paez, E., & Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 49-59.
- Palma, G. (2010). *Biotechnologías de la reproducción* (1ª ed.). Balcarce: Ediciones INTA
- Pardede, B., Agil, M., Yudi, Y., & Supriatna, I. (2020) Relationship of frozen-thawed semen quality with the fertility rate after being distributed in the Brahman Cross Breeding Program. *Veterinary World*, 13(12), 2649-2657.
- Paterson, J., & Engle, T. (2005). Trace mineral nutrition in beef cattle. En *Nutrition Conference sponsored by University of Tennessee*. Recuperado de <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/tracemineralproceedings.pdf>
- Pérez-Holanda, J. B. (1996). Valoración laboratorial de la calidad seminal: correlación con la fertilidad. En *Bovino: Aspectos de patología reproductiva y seminología* (pp. 183-200). Madrid: Consejo General de Veterinarios de España.
- Perry, V. (2021). The role of sperm morphology standards in the laboratory assessment of bull fertility in Australia. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 672058.
- Petrunkina, A., & Harrison, R. (2013). Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys) function. *Reproduction in Domestic Animals*, 48, 11-24.
- Pimentel, C., Deschamps, J., de Oliverira, J., Cardelino, R., & Pimentel, M. (1979). Effects of early weaning on reproductive efficiency in beef cows. *Theriogenology*, 11(16), 421-426.
- Pursley, J., Mee, M., & Wiltbank, M. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology*, 44(7), 915-923.
- Quintero, A., Rubio, J., González, D., Gutiérrez, J., Madrid, N., & López, J. (2011). Identification of cryodamage on plasma membrane integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. *Revista Científica FCV-LUZ*, 21(5), 403-407.
- Quintero Moreno, A., Mayorga-Torres, J., & Maya, W. (2016). El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *Journal of Veterinary Andrology*, 2(1), 30-37.
- Randel, R. (1986). Manejo Reproductivo del ganado cebú con especial referencia a programas de inseminación artificial. *CADIA*, 2(3), 18-22.

- Randel, R. D. (1990). Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *Journal of Animal Science*, 68(3), 853-862.
- Rivera, M. (2013). Manual de biotecnología reproductivas en bovinos. Retrieved, 8(28), 2016. Recuperado desde <http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com/>
- Rodríguez Blanquet, J. B. (2002). Bioestimulación: Una alternativa para incrementar la productividad del rodeo de cría. *INIA Serie Actividades de Difusión*, 288(1), 81-97.
- Rodriguez, E., Gil-Villa, A., Aguirre, D., Cardona, W., & Cadavid, A. (2011). Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente: en busca de un valor de referencia. *Biomédica*, 31(1), 100-107.
- Rodriguez-Martinez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 312-318.
- Rovira, J. (1973). *Reproducción y manejo de los rodeos de cría*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Rovira, J. (1996). *Manejo nutritivo de los rodeos de cría en pastoreo*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Rubio-Guillén, J., González, D., Garde, J. J., Esteso, M. C., Fernández-Santos, M. R., Rodríguez-Gil, J. E., ... Quintero-Moreno, A. (2007). Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(4), 354-357.
- Rutter, B., & Russo, A. (2006). *Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro* (2^{da} ed.). Buenos Aires: Agroveter.
- Saacke, R. (2009). Relevancia de características del semen compensables y no compensables en la fertilidad y la calidad embrionaria en los bovinos. En IRAC-Biogén, *Simposio Internacional de Reproducción Animal* (Vol. VIII, pp. 169-178). Córdoba.
- Saacke, R. G., & White, J. M. (1972). Semen quality tests and their relationship to fertility. En *Proceedings of the 4th Technical Conference on artificial insemination and reproduction* (Vol. 22). Columbia: National Association of Animal Breeders.
- Saacke, R., Nadir, S., & Nebel, R. (1994). Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41(1), 45-50.
- Sales, J., Carvalho, J., Crepaldi, G. A., Cipriano, R., Jacomini, J., Maio, J., ... Baruselli, P. (2012). Effects of two estradiol esters (benzoate and

cypionate) on the induction of synchronized ovulations in Bos indicus cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, 78(3), 510-516.

- Santori, R. (2009). Factores nutricionales que afectan el desempeño en programas reproductivos en bovinos de carne y de leche. En 8^a *Simposio Internacional de Reproducción Animal del IRAC*, Córdoba, Argentina.
- Schlegel, P., & Paduch, D. (2005). Yet another test of sperm chromatin structure. *Fertility and Sterility*, 84(4), 854-859.
- Sharma, M., Singh, M., Sharma, A., & Kumar, P. (2016). Correlation between semen evaluation parameters and fertility of frozen-thawed semen of jersey x local hill cattle crossbred bulls. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 37(1), 52-54.
- Shojaei, H., Kroetsch, T., Wilde, R., Blondin, P., Kastelic, J., & Thundathil, J. (2012). Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology*, 77(5), 940-951.
- Short, R., Bellows, R., Staigmiller, R., Berardinelli, J., & Custer, E. (1990). Physiological mechanisms controlling anoestrus and infertility in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science*, 68(3), 799-816.
- Simonik, O., Sichtar, J., Krejcarkova, A., Rajmon, R., Stadnik, L., Beran, J., ... Biniova, Z. (2015). Computer assisted sperm analysis—the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85(1), 3-11.
- Soares de Lima, J.M., & Montossi, F. (2010). *Sistemas de cría vacuna en Uruguay*. En Jornada Unidad Experimental Glencoe, INIA Tacuarembó.
- Soler, C., Gaßner, P., Nieschlag, E., de Montserrat, J. J., Gutiérrez, R., Sancho, M., ... Cooper, T. G. (2005). Utilización del Integrated Semen Analysis System (ISAS)® para el análisis morfométrico espermático humano y su significado en las técnicas de reproducción asistida. *Revista Internacional de Andrología*, 3(3), 112-119.
- Sudano, M., Crespilho, A, Fernandes, C., Martins Junior, A., Papa, F., Rodrigues, J., ... Landim-Alvarenga, F. (2011). Use of bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in zebu bulls. *Veterinary Medicine International*, 2011(1), 436381. doi:10.4061/2011/436381.
- Tartaglione, C. M., & Ritta, M. N. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 62(7), 1245-1252.

- Tibisa, L., Fernández, V., & Gatic, R. (2002). ¿Puede el análisis seminal per-se predecir realmente la fertilidad potencial en toros? *Revista Científica FCV-LUZ*, 12(3), 202-208.
- Uslenghi, G. (2016). *Factores que afectan la eficiencia reproductiva en bovinos para carne inseminados a tiempo fijo: sal de estradiol, sincronización de la ovulación y calidad seminal* (Tesis de doctorado). Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.C.P.B.A., Buenos Aires.
- Valverde, A. (2021). Importancia de la evaluación de la aptitud reproductiva mediante el análisis de semen por sistemas CASA. *Investiga TEC*, 1(40). Recuperado de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/view/5616/5404
- Van Der Horst, G. (2014). Sperm motility subpopulations and fertility. En *Proceeding of 25th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction* (pp. 73-77). Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Gerhard-Van-Der-Horst/publication/280157877_Sperm_Motility_Subpopulations_and_fertility/links/55ad4a3808aee079921e1f11/Sperm-Motility-Subpopulations-and-fertility.pdf
- Van Lieshout, J. (1995) Report on the AI qualivet group. En *Proceedings 7th European AI vets Meet* (pp.1-40). The Netherlands.
- Veloz, M. (2017). *Evaluación de la calidad espermática de reproductores* (Tesis de doctorado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.
- Vilanova, F., & Ballarales, B. (2005). La evaluación andrológica: justificación y métodos. En *Manual de Ganadería Doble Propósito* (pp. 498-503). Ediciones Astro Data.
- Ward, F., Rizos, D., Corridan, D., Quinn, K., Boland, M., & Lonergan, P. (2001). Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 60(1), 47-55.
- Whisnant, C., Kiser, T., Thompson, F., & Hall, J. (1985). Effect of nutrition on the LH response to calf removal and GnRH. *Theriogenology*, 24(5), 565-573.
- Williams, G. L. (1990). Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 68(3), 831-852.

- Wiltbank, J., Rowden, W., Ingalls, J., Gregory, K.E., & Koch, R. (1962). Effect of energy level on reproductive phenomena of mature Hereford cows. *Journal of Animal Science*, 21(2), 219-225.
- Wiltbank, J., Rowden, W., Ingalls, J., & Zimmerman, D. (1964). Influence of postpartum energy levels on reproductive performance of Hereford cows restricted in energy intake prior to calving. *Journal of Animal Science*, 23(4), 1049-1053.
- Zhang, B., Larsson, B., Lundeheim, N. & Rodriguez-Martinez, H. (1998). Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *International Journal of Andrology*, 21(4), 207-216.
- Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., & Zenzes, M. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 75(4), 674-677.