UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

USO DE SEMEN REFRIGERADO Y CONGELADO EN UN PROTOCOLO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN VAQUILLONAS WAGYÚ

por:

NUÑEZ, Giorgina

ROSÉS, Mariana

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

MODALIDAD: Estudio de caso

MONTEVIDEO
URUGUAY
2024

PÁGINA DE APROBACIÓN
Tesis de grado aprobada por:

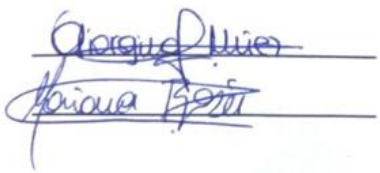
Presidente de mesa: _Dr. Danilo Fila__

Segundo miembro (Tutor): _Dr. Rafael Aragunde_

Tercer miembro:

Fecha: 17/12/2024.

Autores:



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, nos gustaría agradecer especialmente a nuestro tutor de tesis, el Dr. Rafael Aragunde. Su experiencia, comprensión y paciencia contribuyeron a nuestra experiencia en este complejo camino de la investigación.

Asimismo, agradecemos al propietario del campo Alessio Ortolani y al administrador José Baroffio por la disposición y la posibilidad de realizar la investigación en su establecimiento.

Agradecemos también al equipo de Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, por sus sugerencias en el desarrollo de la tesis de grado.

Giorgina

Gracias infinitas a mi familia, mis padres, mi hermano y sobrinos. Fueron mi gran sostén durante todo mi camino como estudiante.

A mi madre, mi gran apoyo y motor durante toda la carrera, gracias por escucharme y entenderme sobre todo en los momentos más complicados.

A mi padre, gracias por tu apoyo, por acompañarme a cada examen y motivarme a seguir adelante.

A mi hermano, gracias por tu apoyo y tus palabras de aliento.

A mis sobrinos Agustín y Ezequiel, gracias por su cariño.

Sin ustedes este recorrida no habría sido posible. Sin duda alguna, han sido el pilar fundamental en este logro.

A mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo a lo largo de la carrera. Su apoyo, confianza y cariño han sido invaluables.

A mi amiga Mari, gracias por recorrer este tramo juntas. Por todo tu apoyo y motivación. Trabajar codo a codo ha sido una experiencia continua de aprendizaje.

Mariana

Quiero agradecer a toda mi familia. a los que están y a los que ya no están.

A mi padre, que fue quien me enseñó a amar la profesión desde chica y, sin duda, uno de mis pilares fundamentales en toda la carrera.

A mi madre, un pilar fundamental en el inicio de mi carrera. Te fuiste antes, pero me dejaste tres remplazos muy importantes.

A Mariana y a mis suegros Lilian y Roberto por preocuparse y ser parte de mi vida en todo momento.

A Willi, mi esposo, que me acompañó en todo este tramo final de la carrera, en mis llantos y también en mis alegrías. Dándome en este año a mi hijo Juan Manuel que es, sin duda, lo mejor que me pasó en la vida.

A mis hermanos, Patricia y Marcelo que siempre estuvieron acompañándome en todo momento.

A mi tío Luis, que siempre me apoyó y ayudó en lo que precisaba.

A mi jefa y amiga Alexandra, que me ha mostrado la profesión desde el lado laboral.

A las gurisas de hándbol, que fueron siempre mi lugar de escape disfrutando de lo que más nos gusta.

Y, por último, a mi gran compañera y amiga de tesis,Gio que, si no fuera por ella estaría todavía luchando con la tesis.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN 2
AGRADECIMIENTOS 3
LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y CUADROS 6
RESUMEN 7
SUMMARY 8
INTRODUCCIÓN 9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 11
Introducción a la Inseminación Artificial y criopreservación de semen. 11
Origen y desarrollo de la Inseminación Artificial 12
Desarrollo de la Inseminación Artificial en el Uruguay 14
Ventajas y desventajas de la inseminación artificial 16
Inseminación Artificial y Eficiencia reproductiva 17
Ventajas del uso de semen refrigerado en IATF 18
Criopreservación: Definiciones y Antecedentes 20
Evaluación seminal 24
Revisión bibliográfica de estudios con semen refrigerado (SR) 27
HIPÓTESIS 32
OBJETIVOS 32
MATERIALES Y MÉTODOS 32
Animales 32
Preparación del material seminal 34
Estudio de concentración espermática y cálculo de dosis. 34
RESULTADOS 37
Porcentaje de preñez 37
Resultados del estudio de parámetros seminales 38
DISCUSIÓN 39
CONCLUSIÓN 44
Implicaciones Prácticas 44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 45

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y CUADROS

FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de preñez de vaquillonas wagyú en IATF para semen congelado (SC) y semen refrigerado (SR) 38

Figura 2: Test de termorresistencia en 4 tiempos en baño maría de 37°C para SC y SR en base de 100 40

TABLAS

Tabla 1: Condición corporal de las vaquillonas por grupo y promedio 33

Tabla 2: Diagnóstico de gestación de vaquillonas Wagyú a los 30 días luego de la IATF para los grupos con SC y SR. Se presentan los números de animales por grupo y los porcentajes 38

Tabla 3: Tabla unificada de estudios de los parámetros seminales para SC y SR. Se registra el % de motilidad individual, el % de espermatozoides con membrana funcional (cola enrollada) evaluado mediante HOST, el % de espermatozoides con membrana alterada (evaluado por Eosina Nigrosina) y el % de espermatozoides sin defectos 39

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la diferencia entre el uso de semen congelado/descongelado (SC) y refrigerado (SR) en la tasa de preñez en vaquillonas sometidas a un protocolo de inseminación a tiempo fijo (IATF). Se evaluaron los parámetros del semen refrigerado utilizando los registros de un trabajo realizado en el 2019 en el establecimiento “El Mirador de la Virgen” (km. 245, Ruta 3, Departamento de Soriano), en vaquillonas mestizas Wagyú x Aberdeen Angus. Las hembras fueron inseminadas a tiempo fijo con SR o SC proveniente de semen colectado del mismo toro. Se realizaron estudios de calidad tanto para SR como para SC y se analizó el porcentaje de preñez luego de la inseminación artificial. El uso de SR resultó en una mayor tasa de preñez luego de la inseminación artificial (P/IA) con un tratamiento de IATF, comparado con el uso de SC (65% vs 42%), encontrando una diferencia significativa (P=0,03). Además, se obtuvieron diferencias significativas para los ensayos de semen en los parámetros del test hipoosmótico HOST: SR 62% de espermatozoides reactivos y para SC 38% (P<0,01) y Test de Termorresistencia (TR) con una motilidad para (SR) t_0= 90% y t_{120}=80% y (SC) en t_0=40% y t_{120}=10%. Además, se realizó la evaluación de la morfología espermática y los resultados fueron: para el SR, 12% y para el SC, 10% (P=0,66). Se realizó el estudio de la motilidad individual, obteniendo un 80% de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme con dirección caudo cefálica para SR y para SC un 60% (P=0,003). Finalmente, se evaluó la integridad de membrana obteniendo un 80,8% de espermatozoides vivos para SR y un 51,4% para SC. En conclusión, el uso de SR en protocolos de IATF da como resultado una tasa P/IA más alta que el uso de SC.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the difference between the use of frozen/thawed (FS) and refrigerated (RS) semen in the pregnancy rate in heifers subjected to a fixed-time insemination (FTAI) protocol. Fresh refrigerated semen parameters were evaluated using the records of a work carried out in 2019 at the establishment “El Mirador de la Virgen” (km. 245, Route 3, Department of Soriano), in crossbreed heifers Wagyú x Aberdeen Angus. The females were inseminated at a fixed time with RS semen or FS from semen collected from the same bull. Quality studies were carried out for both RS and FS and the percentage of pregnancy after artificial insemination was analyzed. The use of RS resulted in a higher pregnancy rate after artificial insemination (P/IAI) with an FTAI treatment, compared to the use of FS (65% vs 42%), finding a significant difference (P=0.03). In addition, significant differences were obtained for the semen assays in the HOST hypoosmotic test parameters: RS 62% of reactive sperm and for FS 38% (P<0.01) and Thermoresistance Test (TR) with a motility for (RS) t_0= 90% and t_{120}=80% and (FS) at t_0=40% and t_{120}=10%. In addition, the evaluation of sperm morphology was carried out and results were: for the RS, 12% and for the FS, 10% (P=0.66). The study of individual motility was done, resulting in an 80% of spermatozoa with uniform progressive rectilinear movement for the RS and for the FSPRM60% (P=0.003). Finally, membrane integrity was evaluated obtaining 80.8% of live spermatozoa for RS and 51.4% for FS. In conclusion, using RSin FTAI protocols, results in higher P/AI rate than using FS.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una herramienta principal para el mejoramiento de parámetros productivos, reproductivos y genéticos, siendo nuestro país uno de los pioneros en su utilización en la región (Cavestany & Méndez, 1993; Giraldo, 2007; Jaime, 2004). Tiene como objetivo principal el mejor aprovechamiento de toros genéticamente superiores y contribuye a bajar el costo del semen dado que el alto costo de los reproductores (o su inaccesibilidad) dificulta el acceso de los productores al semen de toros superiores (especialmente seleccionados por sus características mejoradoras, tanto para la producción de leche como para carne). Debido a que cada eyaculado del toro se divide en muchas dosis, el costo por ternero, producto de la utilización de los toros elegidos, es menor (Cavestany & Méndez, 1993). La disminución en el costo del semen y su aplicación, el menor costo por servicio, menores riesgos asociados a la monta natural, y la utilización de toros de fertilidad comprobada, son elementos que permiten lograr mejores resultados con respecto a la monta natural y por lo tanto favorecen su utilización, obteniendo mayores tasas de preñez (Giraldo, 2007).

Un buen manejo reproductivo es clave para la producción ganadera. La eficiencia reproductiva en ganado de carne se puede medir mediante el número de terneros nacidos o destetados por cada 100 vacas en un año. En el ganado de leche, al tener características más intensivas en la explotación, la eficiencia reproductiva se puede calcular en base a varios parámetros, como intervalos entre partos, intervalo parto a concepción, número de servicios por concepción, porcentaje de preñez, entre otros (Cavestany& Méndez, 1993). La IA ha permitido a la industria lechera mundial, realizar avances en el mérito genético del ganado lechero y un gran beneficio económico para la producción de leche (Giraldo, 2007).

En una encuesta realizada por el Instituto Nacional de la Leche (INALE, 2019) en ganado lechero, se observó que la mayoría de los predios realizaban entore y menos de la mitad utilizaban la IA sola o con repaso con toros. Además, se registró que el 29% de los establecimientos realizaban sincronización de celos y el 10 % Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF). Al estudiar la aplicación de sincronización de celos y de IA en establecimientos que remiten leche y considerando el volumen de producción, los establecimientos que producen menos utilizan menos la IA, (utilizan más los toros) y tienen una percepción menor de que tienen aspectos a mejorar en la reproducción; por el contrario, los mayores productores utilizan más la IA, las técnicas de sincronización de celos (incluida la IATF) y un porcentaje mayor de los establecimientos tienen la percepción de que tienen aspectos a mejorar en reproducción.

Coincidentemente, en establecimientos ganaderos la productividad por hectárea está relacionada a muchos factores y ha sido estimada por medio de un indicador denominado “Eficiencia Técnica” (ET). Este indicador relaciona las variables asistencia técnica agronómica y veterinaria, IA, destete precoz, tipo de tenencia del suelo y personería jurídica (tenencia de la tierra, propietario o arrendatario), entre otros (Aguirre et al., 2023). Se concluyó que aquellos productores con menor eficiencia técnica, utilizan menos IA u otras biotecnologías y tienen menor

producción por hectárea que aquellos de elevada ET. Para el caso de los establecimientos que aplican IA, para los establecimientos de alta ET, el 60% utiliza IA, mientras que en los de baja ET, el porcentaje es de solamente el 4% (Aguirre et al., 2023).

Se podría afirmar que hay margen para la mejora por medio de la aplicación de biotecnologías existentes y que un sistema de transferencia y promoción de buenas prácticas, puede contribuir a disminuir la brecha tecnológica y, por ende, aumentar la producción en los establecimientos ganaderos y lecheros (Aguirre et al., 2023).

En el XX Taller de evaluación de diagnósticos de gestación vacuna del año 2022, organizado anualmente por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria [INIA], 2022, se comunicó que se alcanzó un porcentaje de preñez total del 80%. Se discutió la influencia del manejo reproductivo y la condición corporal (ligada a condiciones climáticas o lluvias durante el período de entore). Se concluyó que existe una diferencia marcada (20%) entre aquellos establecimientos con mejor manejo reproductivo (80% vs 62%). Sin embargo, cuando se estudió la preñez temprana (en los primeros 21 días del servicio), los porcentajes fueron similares (61,9% vs 57,9%). La diferencia radica en que la aplicación de manejo reproductivo (MR) permite atender problemas y, por tanto, se obtienen más animales preñados para el rodeo.
Por otra parte, la aplicación de tecnologías como la IATF en vaquillonas presenta resultados similares a trabajos de IA a celo visto. Comparando establecimientos que realizaron IA a celo visto con los que aplicaron IATF, los porcentajes de gestación fueron similares, con una leve diferencia a favor de la inseminación a celo visto (con sincronización de celos con doble dosis de prostaglandinas o no) (90,2% IACV vs 88,1% IATF), (INIA, 2022).

Además, se observó la influencia de la condición corporal (CC) en los porcentajes de preñez. En establecimientos con vaquillonas con CC baja, los que realizan “manejo reproductivo” presentan una diferencia de +20% con los que se clasifican como “sin manejo reproductivo” (SM) (87,6% CM Vs 60,9% SM). Considerando las vaquillonas de segundo entore, las diferencias entre rodeos que aplican manejo reproductivo y los que no, puede llegar a ser de 40 puntos porcentuales en años de penuria o con baja CC (INIA, 2022). Se concluyó que en los años buenos (de CC alta), la diferencia entre establecimientos con o sin manejo reproductivo se achica, pero en años en los que la CC es baja debido a condiciones climáticas adversas, el manejo reproductivo adecuado mejora los porcentajes de preñez. Aquí se concluyó que hay espacio suficiente para trabajar en la mejora de los porcentajes de preñez temprana aumentando el 60% (INIA, 2022).

En suma, la aplicación de paquetes tecnológicos combinados con una estrategia que mejore la calidad del semen para la IA, utilizados en trabajos de IATF, permitiría mejorar los resultados de fertilidad, aumentar los porcentajes de gestación temprana y mejorar la productividad del rodeo. Una alternativa diferente en el sistema de procesamiento del semen, permitiría lograr una alta tasa de concepción por servicio y aumentar los porcentajes de preñez temprana, lo que redundaría en un incremento del porcentaje de gestación final general en todos los establecimientos y para tener una alta Eficiencia Reproductiva sería

necesario contar con una alta tasa de concepción por servicio (Roche & Diskin, 2005).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Introducción a la Inseminación Artificial y criopreservación de semen.

La IA es una biotecnología aplicada a la reproducción, mediante la cual se deposita semen del macho en el tracto reproductivo de la hembra por un método diferente a la cópula, con instrumental diseñado con tales fines, facilitando el encuentro de los espermatozoides con el o los ovocitos (Morrell, 2011). La IA es la primera gran biotecnología aplicada para la reproducción y mejora genética de los animales de granja, y ha tenido un gran impacto en todo el mundo en numerosas especies, pero en bovinos de leche es donde ha tenido su máximo desarrollo productivo. Los avances de esta técnica, han permitido el desarrollo de otras biotecnologías, como criopreservación de semen y otras células, sexado de espermatozoides, regulación del ciclo estral, colecta y transferencia de embriones, entre otras (Foote, 2002).

Si bien la IA se conocía previamente como resultado de actividades empíricas o algunos estudios científicos, la investigación y aplicación comercial se desarrolló recién a principios del siglo XX. En esa época, la principal motivación fue la aplicación de estrictas medidas de higiene para evitar enfermedades infecciosas transmisibles a través de la cópula; rápidamente, se observaron ventajas productivas y la IA fue integrada a los objetivos productivos de los establecimientos pecuarios (Palma, 2008).

La posibilidad de utilizar toros genéticamente superiores constituye una de las principales ventajas de la IA (Bó et al., 2014). Al principio, el potencial de producción de los toros era estimado de acuerdo a su fenotipo y observado a través del Pedigree (o antecedentes de su línea paterna y materna), (Durán del Campo, 2001). Más tarde, el valor genético de los machos pudo ser estimado exitosamente a través de su progenie, con el desarrollo de exigentes programas de evaluación y selección de los reproductores. El empleo de la genética poblacional y de métodos genético-estadísticos junto con el desarrollo de sistemas estandarizados de evaluación fenotípica de las hembras (perfil lineal) y perfil productivo de la progenie, permitieron el conocimiento pormenorizado del valor genético de los toros evaluados (Palma, 2008).

Como la eficiencia en el incremento del progreso genético de un toro depende del valor genético del mismo, número de dosis empleadas para la inseminación en un tiempo determinado y del tiempo de conservación del semen, la sobrevida del material seminal se convirtió en el principal obstáculo para el progreso de la IA. Así que se tornó necesario conservar el material genético por mucho tiempo, incluso más allá de la vida del reproductor, por lo que se llegó a desarrollar la criopreservación de semen (Palma, 2008). La criopreservación de semen es una biotecnología asociada a la reproducción por la cual el semen (asociado a diluyentes especiales) se congela a temperaturas muy por debajo del cero grado

centígrado, interrumpiendo sus procesos metabólicos y aumentando su sobrevida a décadas (Palma, 2008).

Origen y desarrollo de la Inseminación Artificial

Desde el siglo XIV, se recuperaron relatos donde un jeque árabe recoge semen con un trozo de algodón de la vagina de una yegua servida por un padrillo, insertando el mismo en la vagina de otra yegua, logrando la concepción; no obstante, debido a la dificultad asociada a la IA en equinos y los bajos índices de preñez con dicha técnica, se afirmó que se trataba de fantasías (Viotti, 2011).

En Londres, Van Leeuwenhoek y Hamm son los primeros en observar semen con unos elementos que describieron como “animáculos”. En 1678, Leeuwenhoek publicó un trabajo donde señala que, con el uso de lentes de aumento, era posible observar una innumerable cantidad de cuerpos minúsculos que se movían con fuerza (Foote, 2002). En 1730, el fisiólogo italiano Lazáro Spallanzini realizó la primera IA en una perra, que parió (62 días después) tres cachorros similares a madre y padre. Spallanzani contribuyó además observando que el enfriado del semen prolongaba la vida de los espermatozoides. El semen del padrillo enfriado en la nieve o en el frío no mataba a los “vermículos espermáticos”, pero disminuía su movimiento hasta ser expuestos nuevamente al calor; dicho movimiento continuaba hasta por 7 horas y media (Senger, 2005). En 1825, Dumas confirmó que los “animáculos” podían fertilizar óvulos de conejas y producir embriones, dando lugar al origen de la denominación espermatozoides (Senger, 2005).

En 1907 el científico ruso Ivanov y sus colaboradores investigaron la colecta, dilución y procesamiento de semen trabajando principalmente con equinos, pero también con otras especies. Más tarde, en 1938, Milovanov desarrolló investigaciones en diluyentes para semen y sus proyectos incluyeron la inseminación de ovinos y bovinos. Rusia se convirtió en el primer país en el mundo en utilizar la IA en forma intensiva. Esta tarea les fue encomendada debido a que tenían un gran problema con la baja fertilidad y calidad del ganado. Más tarde, se comenzó a introducir razas inglesas para maximizar el uso de toros e Ivanov desarrolló nuevas técnicas para la colección y dilución del semen (Foote, 2002).

En 1914, en Italia, Amantea inició experimentos con espermatozoides utilizando perros, gallos y palomas y desarrollando una vagina artificial para perros, lo cual contribuyó para que los científicos rusos diseñaran vaginas artificiales para toros, carneros y padrillos (Foote 2002).

Otros sucesos importantes ocurrieron en Dinamarca. En 1930, Sorensen y colaboradores establecieron el método recto vaginal de IA en las vacas. Mediante este método se deposita el semen directamente en el útero a través del cérvix. Esta técnica permitió avances, ya que se necesitaban menores dosis de semen por vaca. En 1936, los daneses fundaron la primera cooperativa de IA difundiendo rápidamente la técnica de IA. Por otra parte, Sorensen y su equipo en 1940 inventan el sistema de empaque de semen en pajuelas de celofán, el

que fue perfeccionado por Cassou en 1964, produciendo las pajuelas plásticas que se utilizan hoy en día. Esto contribuyó a aumentar la utilización de la IA debido a la seguridad que ofrecen las pajuelas en la identificación y la facilidad en el manejo de las dosis de semen (Foote, 2002).

El desarrollo mundial de la técnica fue rápido y la IA se comenzó a aplicar masivamente a medida que los equipos de investigación reportaron sus hallazgos y resultaos. En USA, en 1942, Salisbury aplicó el citrato yema de huevo al semen como diluyente. En 1946 (también en USA), Foote demostró que los antibióticos incorporados al semen diluido eran eficaces en el control de enfermedades venéreas y capaces de mejorar el porcentaje de concepción. Esto es muy importante para disminuir la probabilidad de transmisión de enfermedades reproductivas (Foote, 2002).

En Inglaterra, en 1949, el equipo de Polge, Smith y Parker congeló por primera vez semen de toro, sin dañar las células espermáticas, ni disminuir su capacidad de fertilización. Para ello utilizaron hielo seco y alcohol (-79°C). Más tarde, Polge y Rowson en 1952, observaron que el glicerol protege a los espermatozoides frente a la criopreservación, lo que permite usar temperaturas más bajas para la congelación (-196°C). Desarrollaron entonces un diluyente para semen a base de yema de huevo, citrato de sodio, adicionado con glicerol y después de ser mantenido en frío por algunas horas era congelado (período de equilibración). En 1957, Almquist y O´Dell presentaron un diluyente con leche entera y glicerol. En 1963, Davis et al., desarrollaron el Tris con yema de huevo y glicerol que protege al semen, tanto congelado como no congelado (fresco o refrigerado). Todos estos diluyentes son utilizados en la actualidad en mayor o menor medida (Foote, 2002).

El semen congelado comenzó a ser una realidad y sus ventajas en transporte y manejo se descubrieron rápidamente. En 1957, un equipo técnico al servicio de una cooperativa de productores en USA realizó los primeros trabajos de investigación y perfeccionaron el almacenamiento de semen de toro congelado en nitrógeno líquido. En 1960, en Japón, Nagase y Niwa, desarrollaron el diluyente para la congelación de semen en pellets (pastillas) a base de un azúcar (lactosa), yema de huevo y glicerol. Este diluyente es el que aún se emplea para congelar semen en pellets. En 1961, el Departamento de Agricultura de USA recopila y publica las comparaciones contemporáneas para evaluar a los reproductores utilizados en servicios de IA, de ahí en más, la aplicación de la IA en rodeos, tanto lecheros como de carne aumentó rápidamente (Foote, 2002).

Los problemas en la identificación de las pastillas provocaron numerosos errores, por lo que hoy en día, la IA con semen congelado, se realiza mayormente en pajuelas debido a la precisión de la información que contienen. La abundante y fácil disposición de semen congelado en bovinos provocó la disminución de la utilización del semen fresco hasta casi su totalidad (Durán del Campo, 2001).

Sin embargo, el semen congelado presenta otras dificultades, ya que los procesos de congelación y descongelación alteran la estructura espermática y, por ende, disminuye su fertilidad bajando el porcentaje de gestación (Thomas et al., 1998; Watson, 1995, 2000).

Desarrollo de la Inseminación Artificial en el Uruguay

En Uruguay, la primera IA en rumiantes se realizó en 1936 por el profesor Luis Thomasset Victora con semen fresco en ovinos (Thomasset, 2007). En las décadas del 40 y 50, el Dr. Gutiérrez Fabre y el Dr. D. Jaunsolo trabajan con bovinos y ovinos (Durán del Campo, 2001), y desde la Facultad de Veterinaria (UdelaR), se pone a punto la técnica (Aragunde et al., 1954).

En 1947 observando el impacto mundial que estaba significando la IA, el Plan agropecuario propuso difundir el diagnóstico precoz de preñez, preparar el personal necesario para la generalización de la IA y fomentar la formación de cooperativas de IA para los productores modestos (Bertino & Tajam, 2000).

En 1952, en la Facultad de Veterinaria (Udelar), el Dr. Polge y el Dr. Parkes dictaron sus respectivas conferencias donde anunciaron el éxito de sus investigaciones y mostraron que en Inglaterra ya se inseminaba con semen congelado (Durán del Campo, 2001). A partir de entonces, se impulsó la investigación y el desarrollo de trabajos en IA en bovinos. En 1956, en Uruguay, se crea la empresa BASEMCO (Banco de Semen Congelado), dedicada a la congelación y venta de semen de bovinos (Curbelo & Rodríguez, 2013).

En 1958, nacen en Uruguay los primeros terneros producidos por IA con semen congelado (Durán del Campo, 2001).

Por esa época Uruguay estaba limitado en el desarrollo de la IA debido a que para la congelación de semen se precisaban costosas máquinas y vidrio de alta calidad para las ampollas de semen. Pero desde 1964 y con el aporte de los trabajos de los japoneses Nagase y Niwa, se puso en práctica en nuestro país la técnica de congelación en pellets (o pastillas) y la IA tomó un nuevo impulso contando con buenos resultados. A la conservación en hielo seco, le sucedió la utilización de nitrógeno líquido en bióstatos o bioconservadores. Esto mejoró las posibilidades de manejo del semen congelado. Pero los comienzos fueron dificultosos. Si bien en un principio no se autorizó la importación de bióstaros, en el mismo año (1964) se concretó la primera importación de semen en ese contenedor (Curbelo & Rodríguez, 2013). Pero otro problema fue la dificultad de la provisión de nitrógeno líquido (NL). En este caso, CINOCA S.A, NITROL S.A y AGA S.A. (plantas industriales productoras de gases líquidos, entre otros), comenzaron su producción de forma destacada para su uso en bíoconservadores (Durán del Campo, 2001).

En 1977, los uruguayos Dr. Rafael Cash y Dr. Aníbal Durán del Campo perfeccionaron el método de Nagase y Niwa para congelación de pellets y adaptarlo a la congelación en NL. El método, que incluía colocar gotas de semen con diluyente en una superficie de acrílico en los vapores de NL, nunca se patentó, pero contribuyó a facilitar la congelación de semen a nivel de campo (Durán del Campo, 2001).

Por el decreto 257/1971 del Poder Ejecutivo, autorizó la utilización de semen importado para animales de pedigree, debiéndose realizar una declaración jurada de uso de las dosis importadas. Esta situación era favorable para las

cabañas de toros nacionales, pero sustraía a los productores generales (especialmente lecheros), del beneficio de utilizar semen importado, que incluía fundamentalmente, la información de los toros de su comportamiento en las pruebas de progenie (Dr. Rosés G., comunicación personal, 2024). Más tarde, a través del decreto 182/992 (del 06/05/1992) se autorizó la libre importación y exportación de semen, lo que significó la liberación del uso de semen importado a todo el rodeo nacional. Esta acción redundó en un gran aumento del empleo de la IA, especialmente en los tambos (Dr. Rosés G., comunicación personal, 2024).

En Uruguay, debido al desarrollo de la congelación en pellets (1965), la liberación de la importación de bióstatos (1970) y a la normalización de la producción de Nitrógeno Líquido (1972), la IA a semen fresco en bovinos, quedó relegada hasta casi desaparecer totalmente (Durán del Campo, 2001).

Por otro lado, y como consecuencia de los cambios en los sistemas de producción, especialmente por el uso de protocolos de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF), la utilización del semen fresco merece una reconsideración y para ello son necesarios mayores estudios.

Ventajas y desventajas de la inseminación artificial

Las principales **ventajas** de la inseminación artificial son:

- Mejora genética
- Maximiza el potencial reproductivo de los toros.
- Posibilidad de eliminar el toro en el rodeo con la consecuente mejora en el manejo y disminución de problemas o riesgos.
- Mejor control sanitario; evita la propagación de enfermedades venéreas.
- Al estar más involucrados en la reproducción, hay mayor conocimiento del rodeo, lo que redunda en una disminución de costos por servicio.
- Aprovecha padres incapacitados para la monta (lesión física, etc.), que impide realizar la monta natural.
- Mejora la eficiencia técnica del establecimiento. Hay un control más severo y minucioso de la actividad sexual del rodeo; mejores registros de servicios, diagnóstico y control de la fecundidad, mejorando los porcentajes de parición.
- Facilita los cruzamientos: la introducción del material seminal es más sencilla que la introducción de animales vivos y algunos reproductores (por su tamaño), pueden ver imposibilitada la monta (Roberts, 1979).

Con relación a las **desventajas** de la inseminación artificial:

- Debe ser practicada o guiada por técnicos veterinarios especializados, ya que se necesita personal capacitado, responsables del control de todo el trabajo de IA incluyendo manejo del semen, observación del celo y acto de inseminar.
- Se debe conocer la fertilidad de las dosis y el poder fecundante del toro dador del semen.
- Trabajar con un toro no probado puede provocar pérdida o disminución en la producción. Los toros incorrectamente elegidos no permitirán la mejora genética esperada, incluso pueden aumentar la transmisión de problemas genéticos. (Roberts, 1979)
- Cuando se comienza a trabajar con un programa de IA, la inversión monetaria es alta (compra de equipos, instalaciones, etc.).
- Cuando la técnica no es correctamente utilizada, puede presentarse una disminución de la fertilidad en comparación con la monta natural.

- Al requerir personal capacitado, los costos de aplicación pueden ser mayores si no se obtienen resultados favorables.

- Dificultad en la detección de celos. Especialmente asociadas a razas cebú (Bos Indicus) o sus cruzas.

Inseminación Artificial y Eficiencia reproductiva

La eficiencia reproductiva (ER) es una medida del logro biológico neto de toda actividad reproductiva y representa el efecto integrado de todos los factores involucrados en la reproducción: celo, ovulación, fertilización, gestación y parto (Cavestany, 2005). Está relacionada con la eficiencia productiva del establecimiento y en consecuencia está ligada a diversos factores como son: factores nutricionales, ambientales, de manejo, así como factores genéticos y sanitarios (Álvez, 2019; De Nava Silva, 2004; De Nava Silva & Rodríguez, 1995; Huanca, 2013). El objetivo primordial de cualquier programa de manejo reproductivo debe ser optimizar la ER del rodeo, porque es un componente clave para la obtención de mejores resultados productivos y por ende una mejor rentabilidad de los sistemas de producción lecheros o de carne (Roche & Diskin2005).

Para el análisis de la ER, es importante utilizar registros e indicadores. Se han propuesto indicadores que permiten evaluar el éxito o fracaso de los programas de manejo (Lemaire et al., 2011). Los indicadores pueden ser estrictamente reproductivos, como días abiertos o terneros por año, o indicadores económico-productivos, como cantidad de Kg de terneros destetados por hectárea (De Nava Silva, 2011, 2013). Además, se ha sugerido la confección de un "Índice de Eficiencia Reproductiva", que integra otros factores como la carga animal manejada en el predio, la tasa de reposición y la edad al primer entore (De Nava Silva, 2011). Los parámetros reproductivos ligados a una alta ER en vacas paridas son: involución uterina normal, retomo temprano a la ciclicidad, alta eficiencia en la detección de celo y una alta tasa de concepción por servicio (Roche & Diskin, 2005). Siendo un objetivo a plantear para obtener mayor beneficio económico, preñar más vacas y antes (reduciendo la cola de parición).

Actualmente, el desarrollo de las biotecnologías reproductivas hace posible disponer de alternativas para mejorar la ER en el ganado (Palma, 2008). Con el perfeccionamiento del conocimiento de la fisiología reproductiva y el uso de hormonas que regulan el ciclo sexual, se han desarrollado programas de control de ovulación para realizar IA programadas en un rodeo completo en un solo día. Esta biotecnología es denominada Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF), en la que se colocan hormonas para provocar ovulaciones sincrónicas en la mayoría de los animales (Pursley et al., 1995). La principal limitante de la IA es la detección de celos, ya sea por la propia falla durante la detección, falta de celos y la dificultad de juntar los rodeos dos veces por día durante un período prolongado de tiempo (Pursley et al., 1995). Mediante la IATF, se logra inseminar todos los animales en un rango de tiempo muy acotado independizándose de la limitante detección de celos. Por otra parte, la utilización de hormonas y medidas de manejo en programas de IATF en vacas con cría al pie, permite rescatar y preñar vacas que se encuentran en anestro superficial que no podrían ser

incluidas en protocolos de inseminación artificial con sincronización de celos con doble dosis de prostaglandinas (Bó et al., 2014).

Por tanto, la aplicación de IATF es una herramienta gran impacto para mejorar la ER de los establecimientos ganaderos y lecheros (Bó et al., 2014; De Nava Silva, 2011). No obstante, el grado de sincronía y calidad de las ovulaciones inducidas dependerá de diversos factores individuales, como el desarrollo del folículo que se pretende hacer ovular y las hormonas utilizadas (Menchaca et al., 2013; Wiebke et al., 2023). En general, para obtener buenos resultados de fertilidad, la sincronía entre el momento en el que se realiza la IA y el momento de la ovulación debe ser la adecuada

Existen estudios que indican que las ovulaciones retardadas representan un problema, posiblemente relacionado con la sobrevida del espermatozoide en el tracto femenino (Rodríguez Irazoqui, 2008) y otros que indican que el semen congelado/descongelado sufre alteraciones que podrían afectar su viabilidad lo que podría afectar los índices de preñez a la IATF. En este sentido, se puede pensar que existen espacios para investigar la manera de mejorar los índices de preñez a la IATF.

Ventajas del uso de semen refrigerado en IATF

La calidad del semen a utilizar es uno de los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de realizar un programa de IATF (Bó et al., 2014), ya que si el semen es de buena calidad es posible esperar una alta tasa de fertilización de los ovocitos presentes (Rodríguez Irazoqui, 2008).

La utilización de semen refrigerado se ha desarrollado en países de Europa (Alemania, Francia, Países Bajos, etc.); Nueva Zelanda, Australia y Estados Unidos, entre otros; y en algunos de ellos, está asociada a sistemas productivos estacionales de ganado de leche (Borchardt et al., 2017; Bucher, 2009; Tippenhauer et al., 2021; Wiebke et al., 2023; Yang et al., 2018). Se estima que la utilización de semen fresco refrigerado en inseminaciones bovinas a nivel mundial es de un 5% de todas las inseminaciones artificiales (Borchardt et al., 2017).

Las ventajas de usar semen refrigerado son las siguientes (Borchardt et al., 2017; Borges et al., 2021; Bucher, 2009):

- El mejor aprovechamiento de los machos donadores de semen. La reducción de la dosis inseminante en hasta un 85 % no afectaría los porcentajes de gestación. Por ello, cada eyaculado produciría mayor cantidad de dosis por lo que se podrían cubrir más animales con el mismo animal.

- Permite usar toros que no se desempeñan bien en la congelación de semen.

- Se facilita la utilización de semen sexado. El semen sexado por citometría de flujo presenta reducida criotolerancia debido a que esta biotecnología provoca cierto daño en los espermatozoides. Además, para mejorar el rendimiento del trabajo, se maneja en dosis de inseminación muy bajas (de 1 a 3 x 10^6).

- El costo de mantenimiento de las dosis es inexistente (Bióstatos, Nitrógeno Líquido).

- Disminuyen los riesgos por pérdidas en el mantenimiento del semen.

- Su utilización es más sencilla. Al no haber manipulación en la descongelación, el tiempo total del trabajo de IA es más corto y no hay variabilidad técnica en el semen debido a errores individuales en la descongelación. La duración extendida del semen posibilita trabajar con gran número de animales, por lo que el tiempo de las inseminaciones no desempeñaría un papel principal en el manejo.

La gran ventaja de la utilización del semen refrigerado, es que la viabilidad de los espermatozoides en el tracto reproductivo de las hembras es mayor que cuando se utiliza semen congelado (Bucher, 2009), la gran desventaja de su utilización es su limitada vida útil (3 días). Esto hace que su uso pueda ser justificado siempre que exista una diferencia de fertilidad comparada con el uso del semen congelado (Borchardt et al., 2017).

Se ha estudiado la relación entre el momento de la IA y la ovulación. Se registraron inseminaciones en trabajos de IATF y a celos visto. En rodeos de vaquillonas para carne y vacas con cría al pie, o en vaquillonas y vacas lecheras en producción. En ellos se comparó la preñez de inseminaciones con semen congelado y con semen refrigerado (Borchardtet al., 2017; Bucher, 2009; Tippenhauer et al., 2021; Wiebke et al., 2023). Se analizó el momento de la IA en vacas con celo natural o inducido, controladas con un sistema de monitoreo automático de actividad (AAM, Heatime), se encontró que vacas inseminadas al comienzo del estro, tenían mejores índices de preñez con semen refrigerado; y vacas inseminadas después del final del estro presentaban mejor resultado con semen congelado (Tippenhauer et al., 2021). Por otra parte, se demostró que la inseminación con semen congelado 10h antes de la ovulación proyectada disminuye la tasa de concepción comparado con la IA 5h antes de la ovulación proyectada. Estas dos situaciones podrían deberse a un período más corto de capacitación o a la existencia de una población de espermatozoides capacitados en el semen congelado (Bucher, 2009). Por lo tanto, algunos resultados muestran que el momento óptimo para la IA podría ser diferente cuando se utiliza semen refrigerado que cuando se utiliza semen congelado en diferentes protocolos de IATF (Borchardt et al., 2017). En un estudio en vacas lecheras en producción, se encontró hasta un 25.2% de ovulaciones retardadas (Wiebke et al., 2023).

Se argumentó que, como el momento exacto de la ovulación en un protocolo de IATF no es conocido, las ovulaciones se presentarán en un rango de tiempo en el que el semen deberá estar disponible (rango entre 18 a 48h dependiendo de las hormonas utilizadas) (Menchaca et al., 2013). Debido a ello, se podría suponer que cuando se cuenta con semen con una viabilidad más prolongada (semen refrigerado), se podrían alcanzar mejores tasas de fertilización que cuando se cuenta con semen de corta sobrevida (semen congelado), con menores chances de fecundar (Borchardt et al., 2017; Bucher, 2009; Wiebke et al., 2023).

Criopreservación: Definiciones y Antecedentes

El proceso de criopreservación representa una interrupción artificial del camino de los espermatozoides eyaculados hacia la maduración y fertilización (Watson, 1995). La criopreservación se refiere a una rama de la criobiología por la cual se busca prolongar por tiempo indefinido la vitalidad y funciones metabólicas normales de las células, a temperaturas criogénicas (generalmente -196°C). A esta temperatura se detiene la actividad molecular y no existen fenómenos de difusión, ni existe la energía térmica suficiente para llevar a cabo reacciones químicas. Se logra entonces la detención de la actividad metabólica, la actividad molecular y celular, prolongando la supervivencia de los espermatozoides, que, sumergidos en el nitrógeno líquido, pueden durar por décadas (Fernández et al., 2009).

La criopreservación asociada a la IA representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético. Sus ventajas llevaron a que el uso del semen fresco y/o refrigerado fuera desplazado por el uso de semen congelado (Durán Del Campo, 2001; Elhordoy, 2017). En un relevamiento mundial realizado en 1998, se concluyó que el semen bovino congelado es el método de conservación mundialmente más utilizado concentrando el 95% de las dosis producidas (Thibier M. & Wagner H.G, 2002).

Las ventajas de la criopreservación de semen son principalmente de manejo. Posibilitó usar reproductores a distancia y permitió el suministro de material genético a establecimientos con dificultades de abastecimiento de semen refrigerado (Williams, 2013). Además de conservar semen de un gran número de reproductores por tiempo indeterminado, una ventaja accesoria refiere a que con el uso de antibióticos en las dosis de semen hay un mejor control de enfermedades venéreas (Castelo et al., 2008). Sin embargo, la forma en que se utiliza el semen congelado es uno de los factores que más influye en la IA. Se deben aplicar procedimientos adecuados de descongelamiento respetando rigurosamente tiempos y temperaturas, así como se deben asegurar las condiciones correctas de conservación dentro del termo de nitrógeno líquido para evitar fallas o pérdidas (Marcantonio, 2006).

En el espermatozoide se distinguen tres partes: cabeza (contiene material genético condensado o cromatina), pieza intermedia (contiene mitocondrias que son la fuente de energía de la célula) y cola (flagelo que posibilita el movimiento de la célula). En la cabeza se distinguen, a su vez, tres regiones diferenciadas: acrosoma (zona acrosomal) en el extremo apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. El acrosoma envuelve la cabeza del espermatozoide en su parte exterior y ocupa 2/3 partes de la misma. Está formado por dos capas de membranas y contiene en su interior enzimas como la Hialuronidasa (necesaria para la disrupción de los puentes intercelulares de las células del *cúmulus oophorus* con la consiguiente separación) y la Acrosina (enzima que permite el pasaje de la cabeza del espermatozoide por la zona pelúcida), entre otras enzimas (Noakes & Parkinson, 2001). El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación. Es necesario para la fertilización y en el tracto genital femenino sufre cambios en su membrana (denominados capacitación y reacción acrosómica), que le permiten pasar diferentes barreras para fertilizar el óvulo. De esa manera, la cabeza del espermatozoide liberado

de su flagelo puede llegar a posicionarse en contacto contra la membrana del oocito y así fusionar sus membranas, introducir su ADN (para la posterior formación del pronúcleo masculino) y activar el oocito provocando modificaciones en los niveles de calcio intracelular y otros cambios de la membrana celular (Wassarman, 1999).

La “capacitación espermática” y “reacción acrosómica” o exocitosis son los cambios necesarios que presenta el espermatozoide para lograr la fertilización. Ocurren de manera espontánea en el tracto reproductivo de la hembra, pero son un efecto indeseado durante los procesos de criopreservación (falsa reacción acrosómica). La proporción de espermatozoides con el acrosoma intacto está altamente correlacionada con la fertilidad (Noakes & Parkinson, 2001). Por ello, la evaluación de la integridad de los acrosomas es utilizada para evaluar la calidad de las dosis de semen criopreservado. De acuerdo a la proporción (porcentaje) de espermatozoides que posean reacción acrosómica, la muestra seminal poseerá una fertilidad variable y si es muy alta ese porcentaje, una fertilidad baja (Hidalgo et al., 2005).

La principal desventaja de la criopreservación es que al tratarse de un proceso que causa daño celular, provoca que la fecundidad del semen sea inferior. La criopreservación promueve modificaciones subletales en los espermatozoides que sobreviven, haciéndolos más reactivos al medio post descongelación, pudiendo ser considerados en un estado de “parcialmente capacitados”. La membrana celular de los espermatozoides post descongelados se desestabiliza, muestra una extrema sensibilidad a los cambios osmóticos y presenta cambios en la fluidez, hay mayor permeabilidad a los iones de calcio, Lo que promueve la capacitación y falsa reacción acrosómica (Watson, 1995). La capacitación espermática, la reacción acrosómica y la posterior unión de los espermatozoides al ovocito, requieren de la presencia de una membrana íntegra y bioquímicamente activa. La consecuencia de estos cambios es la reducción de la sobrevida de las células espermáticas (Clarke & Johnson, 1987).

Durante los procesos que involucran la criopreservación, son varios los organelos afectados:

- En la membrana celular, los procesos de congelación y descongelación, producen un estrés térmico que afecta sus membranas (plasmática, externa del acrosoma y mitocondriales), produciendo modificaciones en su organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica, causando daños irreversibles y comprometiendo su supervivencia (Thomas et al., 1998; Watson, 2000; Yanagimachi, 2022). Además de los daños que sufre la membrana en la congelación (*cold shock*), también los sufre en el proceso de descongelación (*warm shock*). Esto debido a que la membrana está sujeta a reordenamientos estructurales que involucran lípidos y proteínas y la rápida difusión del agua puede provocar la ruptura de la célula. Por lo tanto, la fase de descongelación (-196°C a 35°C) es tan importante como la fase de congelación en el mantenimiento de la viabilidad celular (Watson, 1995).

- En el acrosoma se presenta la inducción prematura de la “reacción acrosómica”. Se producen daños, con ondulación de la membrana

externa, formación de botones en los bordes, invaginación de la membrana en la zona media del acrosoma y la formación de una red de túbulos por la que se produce una liberación de enzimas, no presentando efectos en la motilidad (Watson, 1995).

- En las mitocondrias, la función mitocondrial se ve alterada, con la consiguiente disminución en la producción de energía y la consecuente reducción de la motilidad espermática.

- En la cromatina se presentan fallas en la condensación de la cromatina que provocan, a su vez, fallas en la formación de los pronúcleos.

- En el citoesqueleto se producen rupturas y cambios en algunas de las proteínas constituyentes del citoesqueleto (procesos de polimerización y despolimerización) dependientes de los cambios de temperatura y la formación de cristales de hielo. Además, los rápidos cambios de tamaño afectan el sistema de microtúbulos del citoesqueleto. La alteración del citoesqueleto, junto con la alteración de la estructura y funcionamiento de las mitocondrias, afectan la motilidad de los espermatozoides congelados-descongelados y por ende la fertilidad del semen (Watson, 1995).

Todos estos fenómenos deletéreos provocan que muchos espermatozoides mueran o queden modificados y presenten un desplazamiento alterado producto de los procesos de congelación y descongelación (Thomas et al., 1998; Watson, 2000). La funcionalidad dañada de la membrana afecta la fertilización, alterando la unión entre ovocito y espermatozoide. La reorganización estructural de las membranas plasmáticas de la cabeza de los espermatozoides, que ocurre durante la congelación, afectaría su habilidad para interactuar normalmente con las células del tracto genital de la hembra. La reducción en la capacidad de acoplamiento de membranas también es un efecto de la crioinjuria debido, probablemente, a un daño estructural de los receptores de los espermatozoides o por una incompleta formación de los mismos (Watson, 1995). Una pobre motilidad espermática afecta la capacidad de llegar al lugar de fertilización o penetrar la zona pelúcida. La pérdida de motilidad de los espermatozoides puede ser, en parte, explicada por los cambios en el transporte y permeabilidad de la membrana a nivel del flagelo, y también debido a los cambios en los microtúbulos del axonema. El daño provocado por cristales de hielo en las mitocondrias con pérdida de la estructura y por ende de la funcionalidad, contribuye a la disminución de la producción de energía necesaria para el movimiento (Watson, 1995). Debido a esto, los espermatozoides criopreservados muestran un reducido tiempo de supervivencia en el tracto femenino y por lo tanto poseen una menor fertilidad que los espermatozoides frescos (Borchardt et al., 2017; Watson, 1995).

En resumen, el efecto de la capacitación inducida es uno de los mayores factores asociados a la reducción de la longevidad y pobre supervivencia de los espermatozoides criopreservados en el tracto genital de la hembra, resultando

en una reducida fertilidad del semen congelado-descongelado (Borchardt et al., 2017; Watson 1995).

Evaluación seminal

La calidad del semen a utilizar es uno de los factores más importantes a considerar a la hora de realizar un programa de IA. El análisis de varios parámetros relativos a las características funcionales y morfológicas de los espermatozoides permite estimar razonablemente el potencial fecundante de una muestra de semen (Bó et al., 2014; Catena & Cabodevila, 1999).

Existen diferentes criterios para la clasificación de las dosis de semen. En líneas generales, se aplica un criterio diferencial según su modo de preparación: fresco, enfriado o congelado. Además, existen diferentes criterios de rechazo (valores mínimos de aceptación), según los diferentes centros de producción de semen u organismos de control. Por ejemplo, según las recomendaciones de la NAAB (*NationalAsociation of Animal Breeders*, USA), el semen post descongelación, debe presentar como mínimo un 25% de células mótiles a una velocidad 3 (0=sin movimiento, 5=movimiento rápido), inmediatamente después del descongelado y un 15% de células mótiles a una velocidad de 2 luego de 2 horas de incubación a 37°C. La concentración estándar de una dosis de semen debe ser de entre 5 y 10 millones de células mótiles (Bó et al., 2014). Para la sección reproducción de la DILAVE (División de Laboratorios Veterinarios, MGAP), funcional hasta el año 2020, se debe exigir un mínimo de 6 millones de espermatozoides viables morfológicamente normales por dosis; 35% de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme y menos del 30% de anomalías totales con no más de 15% de anomalías mayores (Guarino et al., 2004). Y de acuerdo al Departamento de Reproducción Animal de la Fvet (en concordancia con la Norma ISO 9002), el criterio mínimo de aceptabilidad para semen post descongelado es:

- ✓ Concentración: ≥ 6 - 8 x 10^6 espermatozoides viables
- ✓ Motilidad: ≥ 30%
- ✓ Morfología: ≤ 20 - 25% (acr. intactos ≥ 50%)

En la evaluación de semen post descongelado, las principales regiones que deben ser estudiadas son: el núcleo, acrosoma, flagelo, mitocondrias y membrana plasmática (Lemma, 2011). Además, se proponen pruebas de termorresistencia (viabilidad post descongelación a las 0h y 2h), estudio de la integridad del acrosoma, morfología y número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis, además de estudios microbiológicos (evaluación biológica).

Existen diversas pruebas de laboratorio para estimar la calidad del semen que son muy útiles si son realizadas correctamente e interpretadas con criterio. Estas pruebas de análisis seminal son aplicadas en dos momentos diferentes, el semen fresco previo al procesamiento, que tiene como objetivo evaluar las características del eyaculado que determinan si el mismo se aprueba para ser congelado y posteriormente una evaluación post descongelado que tiene como objetivo conocer si ese semen fue capaz de superar el proceso de congelación-descongelación (Catena & Cabodevila, 1999).

Para el estudio de las dosis de semen para inseminar, se propuso el análisis a nivel de tres parámetros (Barth, 1990, como se cita en Catena & Cabodevila, 1999):

1. Viabilidad post descongelación, a través de la realización del test de termorresistencia y el estudio de vivos y muertos.

2. Cambios en la estructura espermática de los espermatozoides (especialmente funcionalidad de membrana y acrosoma), donde se realiza el test HOST (test de Hipoosmosis o también llamado test de endoosmosis) y el estudio de acrosoma.

3. Número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante, donde se realiza el estudio del porcentaje de motilidad individual y vigor.

Con relación al **punto 1.** El test de termorresistencia espermática. Esta prueba sirve para determinar el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático cuando se los somete a un desafío de larga duración, mediante la incubación de la muestra de semen en un baño María a 37°C durante un período prolongado (Catena & Cabodevilla, 1999). El propósito es evaluar el comportamiento de los espermatozoides cuando se los somete a condiciones semejantes a las que se exponen en el tracto genital femenino de la hembra en celo (Arruda et al., 1992). El procedimiento en general consiste en descongelar una muestra de semen y colocarla en un tubo de análisis e incubarla a una temperatura determinada, evaluando la motilidad progresiva y vigor a lo largo de un tiempo de incubación determinado. Por ejemplo, se puede incubar a 37°C, evaluar la motilidad progresiva y el vigor espermático al inicio, 30, 60, 90 y 120 minutos de incubación, sobre una platina térmica a 37°C con un microscopio óptico a 40X de aumento (Fleitas et al., 1976).

Para el estudio de vivos y muertos, se utilizan técnicas de coloración que miden la capacidad de los colorantes para ingresar a los espermatozoides. Esta capacidad depende del buen funcionamiento e integridad de la membrana celular. Cuando la membrana plasmática se encuentra dañada, algunos colorantes ingresan y permanecen, tiñendo los espermatozoides de un color que dependerá del colorante. Como en el semen se puede presentar un número variable de espermatozoides muertos, débiles o no viables, es de suma importancia determinar el porcentaje de espermatozoides dañados. Para este estudio, se describen coloraciones simples, dobles o triples. El objetivo es realizar la observación en un mismo procedimiento, de las diferentes partes de los espermatozoides que puedan presentar daño o presentar defectos. Uno de los colorantes más utilizados es la eosina, que penetra en las células con la membrana dañada y los tiñen de rosado. Usualmente se utiliza una tinción de fondo (como la nigrosina), para visualizar los espermatozoides por contraste. Se puede utilizar otra coloración para teñir el acrosoma y pieza intermedia como el Giemsa. La aplicación de estas técnicas debe contar con estrictos procedimientos estandarizados para que los resultados sean comparables.

Con relación al **punto 2.** La prueba hipoosmótica HOST (Hypo-osmoticSwelling test). Esta prueba, que inicialmente fue desarrollada para humanos (Jeyendranet al., 1984) y posteriormente utilizada para valorar la calidad seminal en varias especies, permite evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática. La membrana debe estar físicamente intacta y bioquímicamente activa para que el espermatozoide pueda mantenerse vivo y activo y poder cumplir con el proceso

de fertilización, capacitación, reacción acrosómica y fusión espermática al ovocito.

La prueba hipoosmótica es un indicador más preciso que las coloraciones supravitales para el análisis de la membrana, pues la fertilización no ocurre si la membrana se encuentra estructural o físicamente intacta, pero bioquímica y funcionalmente inactiva (Sánchez et al., 2002).

La prueba de HOST se basa en la observación de los cambios morfológicos que sufren los flagelos de los espermatozoides cuando son expuestos a un medio hipoosmótico. El objetivo de la prueba es provocar un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular e intracelular. El espermatozoide intentando vencer el desequilibrio osmótico, permite el ingreso de agua al compartimiento intracelular y esto provoca que aumente el volumen celular, observándose que los flagelos se doblan en diferentes grados. Los espermatozoides con membrana íntegra y funcionalmente activa se verán con la cola enrollada y aquellos en que existe falla en la funcionalidad de membrana presentan la cola recta.

La prueba hipoosmótica convencional (HOST) consiste en la incubación de 5 µL de semen con 45 µL de una solución de fructosa y ácido cítrico de osmolaridad 55 mOsm/L por 45 min a 37°C (Jeyendranet al., 1984). Se validó también una prueba hipoosmótica simplificada (HOST-s) en la que se diluye 5 µL de semen con 45 µL de agua bidestilada de osmolaridad 0 mOsm/L, incubando por 5 min a 37°C (Sánchez et al., 2002).

Con respecto al estudio del acrosoma, la determinación del porcentaje de acrosomas intactos es un método morfológico de medición de la viabilidad post-descongelación que tiene correlación con la fertilidad. Cobra especial importancia la evaluación del acrosoma midiendo lo que se denomina “falsa reacción acrosómica". Para ello se realizan coloraciones sobre un frotis ya fijado, utilizándose la tinción de Giemsa cuya lectura se realiza en microscopio óptico bajo aceite de inmersión a 1000x. Otros métodos de observación incluyen microscopio con contraste de fases y la elaboración de frotis húmedos con dilución del semen en glutaraldehído bufferado al 0.2% o en formol salino bufferado con observación a 1000x (Catena & Cabodevila, 1999).

Con relación al **punto 3.** El estudio de la motilidad individual de los espermatozoides es muy importante, dado que la fertilidad se relaciona con la cantidad de espermatozoides vivos en la dosis de semen con movimiento rectilíneo uniforme con dirección caudo cefálica. El porcentaje de motilidad progresiva (porcentaje de motilidad individual) y el vigor es determinado inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación en la prueba de termorresistencia. Una gota de semen delgada y uniforme es colocada entre porta y cubreobjetos tibios procediendo a evaluar a 100 o 400x el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y la tasa de progresión (vigor). Esto es cuantificado utilizando una escala del 0 al 5. Si es necesario, debido a su concentración, se puede diluir el semen en Citrato de sodio 2.96% o en suero fisiológico, siempre respetando la igualdad de temperaturas (Catena & Cabodevila, 1999).

Para obtener un resultado cierto y repetible, es necesario la aplicación rigurosa de una técnica de laboratorio que incluye técnicos capacitados y materiales de

calidad comprobada. Algunos centros de producción de semen utilizan esta técnica de forma manual, realizada por un operador. Sin embargo, estos análisis han sido cuestionados por su subjetividad y por ser laboriosos y lentos. En establecimientos de gran producción de semen y con mayores presupuestos, se utilizan sistemas multiparamétricos de análisis, combinando sistemas computarizados CASA, conjuntamente con citometría de flujo para un más rápido y completo sistema de control de calidad (Vincent et al., 2012). Además, se diseñaron nuevos análisis en laboratorios de alta tecnología combinando análisis computarizados para la calidad seminal (CASA y otros) y otras pruebas más sofisticadas, donde se evalúa la fragmentación de ADN, pruebas de análisis de la integridad de la membrana plasmática mediante el uso de dos fluorocromos combinados (Ballachey et al., 1988), análisis de la funcionalidad mitocondrial e integridad acrosomal utilizando fluorocromos y otros test que incluyen Fecundación In Vitro (Muiño et al., 2005).

La ventaja de estos métodos es que disminuyen o eliminan la variabilidad humana en la evaluación, pero en la actualidad no son aplicables a nivel de campo. Los métodos clásicos de análisis de semen son poco costosos, pero requieren más tiempo y dedicación mientras que la experiencia del operario es clave para la correcta evaluación de los parámetros seminales. Las técnicas más avanzadas son más rápidas y objetivas, pero requieren de equipamiento costoso y personal capacitado. Por lo tanto, se puede afirmar que las técnicas clásicas son aplicables para la evaluación ocasional de la fertilidad de toros, mientras que los métodos más avanzados serían implementados por centros de toros o centros de investigación (Cenariu et al., 2018).

Revisión bibliográfica de estudios con semen refrigerado (SR)

En 1949 Polge, C. & Rowson desarrollaron con éxito la congelación de semen utilizando glicerol. Esto contribuyó a resolver algunas problemáticas que se presentaban por esa época en cuanto a la disponibilidad y transporte del semen en cuanto a la accesibilidad del material genético a los establecimientos. Desde ese momento, el uso de semen refrigerado comenzó a quedar relegado a un segundo plano (Durán del Campo, 2001).

Las líneas de investigación modernas para la utilización de SR, se desarrollaron con dos objetivos principales, la disminución de la cantidad de espermatozoides utilizados por dosis, logrando así un mejor aprovechamiento de los machos superiores seleccionados, y la mejora en los porcentajes de preñez a la primera inseminación en sistemas de producción con IATF.

En algunos países, como Irlanda, Nueva Zelanda y Alemania se comienza a investigar cómo maximizar el uso de toros genéticamente superiores, siendo en ese contexto que se extiende la utilización del semen refrigerado en sistemas productivos estacionales (Borchardt et al., 2017; Borges et al., 2011; Bucher, 2009; Tippenhauer et al., 2021; Yang et al., 2018;). Además, con el desarrollo de la IATF en los años 90, surgió la idea de revalorizar el uso del semen refrigerado buscando mejorar los índices de preñez a la primera inseminación artificial. Se observó que como los sistemas de procesamiento de semen congelado (SC) dañan y matan muchos espermatozoides, la utilización de semen refrigerado

(SR) podría brindar mejores resultados de preñez a la primera IA (Borges et al., 2011).

En Nueva Zelanda, se estudió el uso de semen fresco y se encontró una diferencia en la preñez a la Inseminación Artificial (P/IA) a favor de la utilización del semen refrigerado (Yang et al., 2018).

Se han investigado numerosos factores que podrían influir en la utilización diferencial de SR y SC. Estos incluyen: concentración espermática, tipo de pajuela, composición del diluyente, tiempo y temperatura de preservación, método de utilización (precalentamiento o no), protocolo hormonal utilizado, categoría de las hembras, cantidad y tipo de toros utilizados, sensibilidad individual de los toros a la conservación del semen, entre otras variables (Borges et al., 2021).

En 2021, Borges et al. publican su línea de investigación en la que presentaron diferentes trabajos basados en la comparación de semen criopreservado versus semen refrigerado por 24 horas a 5°C en protocolos IATF incluyendo el estudio de varios de los factores anteriormente mencionados: la utilización de glicerol o no en el diluyente para semen refrigerado en IATF; uso de semen refrigerado por 24 o 48 horas conservado a 5°C en IATF; uso de diferentes modelos de pajuelas en el SR en IATF; evaluación (in vitro) de semen refrigerado durante 15 días a 5°C utilizando 3 diluyentes comerciales; uso de semen refrigerado por 72 hs conservado a 5°C en IATF; uso de semen refrigerado por 24 hs conservado a 5°C en IATF comparando dos diluyentes comerciales; uso de semen refrigerado por 24 y 48 hs conservado a 5°C en IATF comparando dos diluyentes comerciales (Borges et al., 2021).

Todos estos trabajos concluyen que el semen refrigerado por 24 horas a 5°C comparado con el semen congelado del mismo toro, aumenta la tasa de preñez y el semen refrigerado por 48 horas a 5°C presenta una tasa de preñez similar que el refrigerado 24 horas a 5°C. Sin embargo, el semen preservado por 72 horas a 5°C disminuye la tasa de preñez comparada con 24 y 48 horas. El semen refrigerado por 24 o 48 horas a 5°C en diferentes diluyentes comerciales posee una misma tasa de preñez. Resultados in vitro indican que el semen presenta índices satisfactorios de movilidad y vigor en diferentes diluyentes durante 96 horas. Semen refrigerado 24hs a 5°C en pajuelas comunes presenta igual tasa de preñez que en pajuelas especiales (Borges et al., 2021).

Factor concentración espermática:

En 2009, Bucher en un proceso de validación para USA de la técnica utilizada en Nueva Zelanda, comparó los porcentajes de preñez de vacas cruzas con Angus inseminadas en un trabajo de IATF con un protocolo CO- Synch (que utiliza GnRh+CIDR+PgF2+GnRH en un protocolo de 7 días de CIDR), con semen congelado en comparación con semen refrigerado. Este autor usó semen del mismo toro y lo dispuso en pajuelas 0.25 ml utilizando 20 x 10^6 espermatozoides por pajuela para semen congelado y 3 x 10^6 espermatozoides para semen fresco. Encontró similares porcentajes de gestación para ambas presentaciones y concluyó que la utilización de semen fresco a una concentración de 3 x 10^6 podía ser utilizada en protocolos de IATF sin variar los

porcentajes de parición. Dejó planteada la inquietud de que, debido a la mayor sobrevida de los espermatozoides del semen refrigerado en el tracto genital de la hembra, su utilización en vacas con ovulaciones retrasadas podía incrementar el porcentaje de preñez (Bucher, 2009).

Factor calidad del semen y evaluación seminal como pronóstico de fertilidad.

Se comparó el uso de semen refrigerado (SR) y semen congelado (SC) utilizando 3 toros y realizando IATF en rodeos de vacas, usando la misma concentración de espermatozoides de 25 x 10^6 (Borges et al., 2021). Se destacaron varias ventajas en el uso de semen refrigerado en IATF; Además, el semen refrigerado presentó mayores porcentajes de espermatozoides con membranas intactas (evaluadas con HOST) y de motilidad al test de termorresistencia, en comparación con el semen congelado; sin embargo, se consideró que esta evaluación no contribuiría a predecir los porcentajes de fecundación (Borges et al., 2021).

Factor tratamiento IATF:

Por otra parte, Borchardt et al., (2017) estudió los porcentajes de preñez de vacas lecheras inseminadas con semen congelado y descongelado comparadas con el uso de semen refrigerado utilizando protocolos Ovsynch (GPG), siendo administrada la 2ª dosis de GnRH 56h desde la Pgf2α e inseminadas conjuntamente con la GnRH con semen refrigerado (10x10^6) o congelado (20 x 10^6). Estos autores encontraron mejores índices de preñez para semen refrigerado en protocolo GPG con GnRH a la IA y no observaron diferencias cuando la inseminación se realizó 16h más tarde de la GnRH. Fundamentan que la práctica del uso de IA, conjuntamente con la segunda dosis de GnRH, disminuye la cantidad de veces que se manipula el ganado y evita problemas de manejo. Argumentan que la mayor vida de los espermatozoides en el tracto de la hembra posibilita mejores resultados cuando las ovulaciones se retrasan y recomienda estudiar la IA con semen refrigerado en vacas con detección del celo con diferentes horas desde la IA a la ovulación.

Factor semen. Diluyentes Temperatura de almacenamiento:

En 2005, se compararon diferentes diluyentes para semen refrigerado (CEP-2 Caprogen y Triladyl), en estudios in vitro (Verberckmoes et al., 2005). Por otra parte, se observó que el uso de glicerol en semen refrigerado (SR) no afecta la preñez, siendo considerado un beneficio, ya que es posible usar el mismo diluyente y procedimiento estandarizado para el uso del semen congelado (Papa et al., 2014). Otros estudios ratifican que el diluyente con glicerol puede ser utilizado para semen refrigerado sin interferir con la tasa de preñez (P/IA) (Borges et al., 2021).

En 2018, se presentó un trabajo sobre el efecto de conservación a diferentes temperaturas con semen diluido con INRA96, en la tasa de preñez en vacas en rodeos comerciales (diferentes razas), mostrando que el semen mantenido a una temperatura constante de 15°Ctiene mejor índice de no retorno comparado con temperaturas fluctuantes entre 5 y 15°C (Murphy et al., 2018). Además, se constata que diferentes toros presentan variaciones en el comportamiento (en

índices de no retorno), según la forma de preservación del semen; algunos se comportan mejor con semen refrigerado que con semen congelado y viceversa.

Ese mismo año se estudió la aplicación de diferentes diluyentes de semen observando que TRIsaminometano sin raffinosa + yema de huevo se comporta mejor que CEP sin BSA +albúmina de huevo en vacas Brahman (Yekti et al., 2018).

En 2020, se publicaron resultados que demuestran que el uso de Andromed es superior como diluyente al TRIs aminometano + 20% de yema de huevo y CEP-3 + 20% de yema de huevo (Hudiatma et al., 2020).

Factor categoría y factor toro:

En Argentina se publican estudios que comparan el uso SR y SC. Tríbulo et al. (2005) no encuentra diferencias significativas en vaquillonas utilizando 2 toros, mientras que Lopepe (2015) realiza IATF en varias categorías de animales (con 6 toros para SR) y compara el uso SC comercial de 11 toros diferentes, encontrando diferencias significativas a favor del SR (Lopepe, 2015).

Nuevos estudios sobre el uso de semen refrigerado y congelado en rodeos comerciales de Alemania en inseminaciones (IATF y clásicas),con control de celo con un sistema de monitoreo automático, muestran que vacas inseminadas al comienzo del estro (5 horas antes a 12 horas después del fin del estro), presentan mejores índices de preñez con semen refrigerado, mientras que vacas inseminadas de 13 a 18 horas después del final del estro presentan mejores resultados con el semen congelado (Tippenhauer et al., 2021).

Wiebke et al. (2023) concluyen que el semen refrigerado (SR) mantiene su capacidad fecundante por períodos más prolongados y justifican su uso en vacas de leche lactando con ovulaciones retardadas. Para su trabajo, utilizaron semen del mismo toro y lo dividieron en dos fracciones, una para refrigerado (SR) y otra para congelado (SC). Utilizaron diferentes diluyentes y diferentes dosis. El semen refrigerado fue diluido en Caprogen (9×10^6 espermatozoides por pajuela) y el SC fue diluido en BioXcell (25×10^6 espermatozoides por pajuela).

Nuevos desafíos:

Crepaldi (2023) mostró que la aplicación del proceso de sexado de espermatozoides no compromete el P/IA ni los parámetros de laboratorio en relación al semen convencional cuando la IA es realizada con semen refrigerado. Además, considera que es posible inseminar con semen sexado refrigerado 48h después de retirado el dispositivo de progesterona, sin reducir la preñez, similar a lo que se realiza con semen congelado. También concluye que es posible reducir la dosis a $2x10^6$ sin perjudicar el P/IA y el semen refrigerado puede ser usado 48h después de procesado sin comprometer el P/IA.

En resumen: La utilización de SR está siendo revalorada en diferentes países y por diferentes autores. Se ha visto como una necesidad, la validación de los protocolos para los trabajos de IATF con SR con el fin de adaptarlo a las diferentes realidades de cada país. Como ejemplo, Bucher intenta replicar la

experiencia de Nueva Zelanda y extrapolarlo a la realidad de USA observando que el mejor aprovechamiento del toro es clave para la producción en su realidad. Hudiatma et al., 2020 comparan varios diluyentes para SR debido a que algunos diluyentes no están disponibles en su país o son muy caros. Por otra parte, Borges J. desarrolla su línea de investigación en la aplicación de SR investigando numerosos factores que pueden influir en la IA con SR, buscando las condiciones para obtener la mejor tasa de preñez a la primera IA y de sus resultados recomienda algunas condiciones para la aplicación del SR en IATF en establecimientos con gran número de animales en Brasil. En nuestro país no hay trabajos que estudien la aplicación del SR y si ésta puede ser una biotecnología recomendable para nuestro medio. Se ha demostrado internacionalmente, que el trabajo de criopreservación causa daño en gran cantidad de espermatozoides los que presentan un estado reactivo que les hace disminuir su vitalidad y acortar la sobrevivencia en el tracto reproductivo de la hembra. Esto provoca que la cantidad de células por dosis de SC deba ser mayor para que se obtengan aceptables resultados de gestación. La disminución del daño celular presente en el SR, el aumento de la vida útil en el útero y por lo tanto la posibilidad de trabajar con microdosis (con baja cantidad de espermatozoides) son oportunidades ideales para la aplicación en nuevas biotecnologías como el sexado de semen. En el procedimiento de separación de células se dañan numerosos espermatozoides los que de ser sometidos a criopreservación sufrirían mayor daño aún, reduciendo la eficiencia de cada eyaculado y tornando el trabajo de sexado de semen poco atractivo económicamente. Todos los autores coinciden que deben realizarse más investigaciones sobre el uso de semen refrigerado en IATF.

HIPÓTESIS

El uso de semen refrigerado aumenta el porcentaje de preñez comparado con el uso de semen congelado en vaquillonas sometidas a un protocolo de IATF y los parámetros seminales para SR son mejores para, TTR, HOST, motilidad individual y porcentaje de vivos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la criopreservación de semen afecta en forma negativa la tasa de preñez en mayor medida que la refrigeración de semen en un rodeo de vaquillonas inseminadas a tiempo fijo.

Objetivos específicos

Evaluar la diferencia entre el uso del semen congelado/descongelado y refrigerado en la tasa de preñez en vaquillonas sometidas a un protocolo de IATF.

Realizar el análisis de semen congelado/descongelado y semen refrigerado previo a la IATF para los siguientes parámetros: motilidad individual, HOST, test de termorresistencia, test de vivos y muertos y morfología espermática para evaluar cómo afecta la criopreservación al semen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron los registros de un trabajo realizado en el año 2019 en el establecimiento “El Mirador de la Virgen” (km. 245, Ruta 3, Departamento de Soriano), donde se realizó una IATF en vaquillonas, con semen de un toro al que se realizó la colecta, evaluación y conservación del semen. El toro fue previamente revisado (examen de aptitud reproductiva completo, incluido espermiograma) y fue encontrado como potencialmente apto para la reproducción. Para inseminar se utilizó el semen colectado, el cual fue dividido en dos fracciones: congelado/descongelado y refrigerado.

Animales

Los animales (toro y vaquillonas) se encontraban en el mismo establecimiento, en diferentes potreros. Todos los animales se encuentran vacunados con las vacunas y dosificaciones correspondientes (vacunas: Carbunco, Campilobacteriosis, Clostridiosis y dosificaciones: Parásitos gastrointestinales, Saguaypé). Las vaquillonas estaban alimentadas a campo natural y en silvopastoreo (en los espacios libres como cortafuegos y otras zonas entre la implantación de los árboles). El toro estaba alimentado a campo natural.

A las vaquillonas se les realizó examen ginecológico (de acuerdo al score de Anderson), a un rodeo de 97 vaquillonas de raza cruza Wagyú x Aberdeen Angus, púberes, de año y medio, con un rango de peso 287.71 ± 8.35 Kgs y condición corporal de 3.494 ± 0.33 en una escala del 1 al 8, siendo 1 estado de emaciación y 8, estado de obesidad (Mendez et al., 1988) los valores por grupo y promedios se observan en Tabla 1.

Tabla 1. Condición corporal de las vaquillonas por grupo y promedio No se observó diferencia significativa entre los grupos SC y SR.

Vaquillonas	SC N= 48	SR N = 49	Promedio SC + SR
CC	3.513 ± 0.35	3.505 ± 0.32	3.494 ± 0.33
Peso	285.58 ± 9.05	289.79 ± 7.09	287.71 ± 8.35

Se inseminaron de acuerdo al siguiente protocolo:

Día 0: Inserción de dispositivo intravaginal (DIV) impregnado con 1g de progesterona (CIDR®) + 2mg de Benzoato de estradiol IM.

Día 7: Retirada del DIV + 500µg de Prostaglandina F2α (Estrumate®, MSD Animal Health) + 300UI de eCG (NOVORMON® 5000 Syntex) + 0,5mg de cipionato de estradiol (CIPIOSYN® Syntex).

La IATF comenzó a las 52 horas de retirados los DIV y terminó antes de que se cumplieran las 56 horas de ser retirados. Se realizó IATF con ambas fracciones de semen al azar (semen refrigerado o congelado). A medida que las vaquillonas entraron al cepo para ser inseminadas, fueron asignadas en forma intercalada conformando un grupo de semen refrigerado (SR) de n= 49 y otro de semen congelado (SC) de n= 48.

Se realizó el registro de peso y CC a las hembras y se comparó los promedios para los grupos SR y SC.

El SC se descongeló en baño María a 35°C durante 40 segundos, de a una dosis por vez inmediatamente antes de su utilización.

El SR se encontraba almacenado en una conservadora con una temperatura entre 4 y 6°C; las pajuelas se retiraban de la conservadora con refrigerante y se cargaban directamente en el aplicador (pistola), sin pasar por baño María, para inseminar en el momento.

En el momento de la inseminación, los datos se recolectaron con un bastón de lectura de chip en una planilla electrónica donde se registró la siguiente información: fecha y hora en que se realizó el procedimiento, identificación del SNIG (trazabilidad individual), con qué tipo de grupo de semen eran inseminadas y condición corporal.

Preparación del material seminal

La inseminación de todas las vaquillonas, se realizó con semen proveniente de una única colecta de un solo toro. El semen se colectó por electroeyaculación la tarde anterior a la IATF. Para ello se utilizó un electroeyaculador *LanePulsator IV - Auto Adjust*™ con ciclo de estimulación automático.

Antes de separar las dosis para refrigeración o congelación, al semen obtenido, se le realizó un espermiograma que incluyó un examen macroscópico (volumen, color, aspecto y motilidad de masa macroscópica) y un examen microscópico (con microscopio óptico Motic, Serie B1, Vancouver, Canadá), donde se evaluó la motilidad de masa microscópica (escala de 0 a +++), motilidad individual y concentración.

Datos del semen obtenido:

Examen macroscópico:

- Volumen 11 mL.
- Color blanco lechoso.
- Aspecto lechoso.
- Motilidad en masa macroscópica (MMM) No (0).
- Examen microscópico:
- Motilidad de masa microscópica (MMm): ++.
- Motilidad individual: 90 %
- Concentración: 450 x 10^6 espermatozoides por mL.

Para preparar las dosis de semen congelado (SC) y semen refrigerado (SR) se utilizó un único diluyente, AndroMed® (MinitübGmbH).

El diluyente se preparó colocando 800mL de agua bidestilada (precalentada a 35°C) en una probeta de 1000mL, donde se le fue agregando lentamente la solución concentrada del frasco original (también previamente atemperado a 35°C). Esta solución se fue agitando permanentemente hasta lograr una mezcla homogénea (AndroMed). Inmediatamente después de la colecta, se colocó el semen a baño María entre 35 y 37°C, mientras se realizaban las diferentes devaluaciones. Con el fin de que la temperatura al momento de la mezcla se encuentre homogénea, se colocó el tubo con el semen en el mismo baño María donde se tenía previamente al diluyente Andromed. Seguido a la colecta, se realizó la primera dilución de semen en una proporción 1:1 con el fin de protegerlo hasta comenzar su procesamiento.

<u>Estudio de concentración espermática y cálculo de dosis.</u>

Del eyaculado puro (previo a su primera dilución), se extrajo una muestra de 25µl para colocar en 4975 µl de Formol Salino Bufferado y así llegar a 5000µl (5mL). Esto corresponde a una dilución de 1/200. Se procedió entonces a homogeneizar y enseguida cargar la cámara de Neubauer para realizar el conteo de espermatozoides. Luego de 5 minutos se procedió a contar los espermatozoides en la cámara (contando 5 cuadros chicos, de acuerdo al método estándar,

evitando contar dos veces los mismos espermatozoides). Con la cantidad de espermatozoides contados corrigiendo por factor de dilución, profundidad de la cámara y total de área de la cámara, se calculó la concentración de espermatozoides por mL.

La concentración de espermatozoides por mL multiplicado por el volumen obtenido nos dio la cantidad total de espermatozoides del eyaculado.

Cálculo de dosis:

El objetivo fue colocar 30 x 10^{6} espermatozoides por dosis.

Los valores obtenidos fueron:

Semen colectado:

- Concentración: se contaron las dos cámaras de la cámara de Neubauer y se promedió su valor. El total de espermatozoides contados en los 5 cuadros, fue de n=45. Este valor corregido por el factor cámara (x5) dilución (x200) y profundidad de cámara (x10) que es equivalente a: n x 10.000. Como n=45, la concentración es de 450.000 espermatozoides por mm^3. Es decir, concentración total: 450 x 10^6 espermatozoides por mL.

- Número total de espermatozoides del eyaculado (volumen x concentración): 11mL x 450 x 10^6 = 4.950 x 10^6 de espermatozoides totales.

- Número de dosis a obtener (ND): Número total de espermatozoides del eyaculado (NTE) / Número de espermatozoides por dosis (NE). 4950 x 10^6 espermatozoides (NTE) / 30 x 10^6 espermatozoides (NE) = 165 dosis (ND).

- Cálculo de volumen necesario: ND x Volumen de la dosis (pajuelas de 0,5mL) = Volumen total (Semen + Diluyente). 165 dosis x 0,5mL = 82,5mL (diluyente + semen puro).

Como se agregó un volumen de 11mL a los 10 minutos de la colecta (primera dilución), el volumen a agregar es:

Volumen total - (Volumen seminal + Volumen primera dilución) = Volumen para agregar

82,5 - (11+11) = 60,5 mL de diluyente

Volumen a agregar = 60,5mLagregado para obtener la dilución final.

El volumen total de semen se empacó en pajuelas de 0,5mL, refrigeradas en heladera. Este procedimiento cubre el período de equilibración, ya que para congelar las muestras de semen se deben mantener en refrigeración a una temperatura de 5°C por un período de una hora y media o dos horas. Posteriormente, la mitad de las pajuelas tomadas al azar, se sometió a un protocolo de criopreservación (protocolo Andromed®). De acuerdo al mismo, las pajuelas se colocaron en un rack, en una conservadora con nitrógeno líquido

(NL), a una distancia de 4 cm entre las pajuelas y el espejo de NL. Allí permanecieron por 10 minutos para luego sumergirlas en NL. Por último, se acondicionaron en los canister de un biostato. La otra mitad, que corresponde a las pajuelas de semen refrigerado (SR), permanecieron en heladera a 5°C hasta su uso.

Todas las inseminaciones fueron realizadas por un mismo inseminador. Para lograr una distribución al azar, la inseminación se realizó en forma alternada, una vaquillona con SC y la siguiente con SR a medida que entraban en el cepo. El diagnóstico de preñez se realizó mediante ecografía con sonda de 5 Mhz. (AgroScan ECM, Angoulême, Francia), 30 días después de la IATF.

Posteriormente al tratamiento de congelación, se descongelaron 5 pajuelas de SC y se atemperaron 5 pajuelas de SR en baño maría a 37°C durante 40 segundos para analizar, tanto para SR como para SC se le realizaron los siguientes estudios:

1. Motilidad individual; medida en quintos por observación en microscopio óptico como mótiles con movimiento uniforme progresivo caudo cefálico o no.
2. El test de funcionalidad de membrana (HOST), con una alícuota de semen incubado durante 40 minutos en una solución hiposmótica preparada con sucrosa; se consideró funcionales a los espermatozoides con la cola enrollada y no funcionales con la cola recta.
3. Test de termorresistencia; se mantuvo las dosis de semen en baño María a 37°C y cada 30 minutos (hasta completar la utima observación a los 120 minutos), se extrajo una gota de semen donde se observó el porcentaje de espermatozoides mótiles.
4. Test de vivos y muertos realizado en un frotis con tinción Eosina-Nigrosina, considerando a los espermatozoides rosados como muertos, contados en una base de 100 espermatozoides total.
5. Con el mismo frotis utilizado para la tinción de Eosina-Nigrosinase identificaron anormalidades según su ubicación dentro de la estructura del espermatozoide, siendo clasificadas como defectos en cabeza, pieza media o cola, considerando como normales a los que no presentaban ningún defecto y anormales a los que tenían algún defecto.

Análisis estadístico

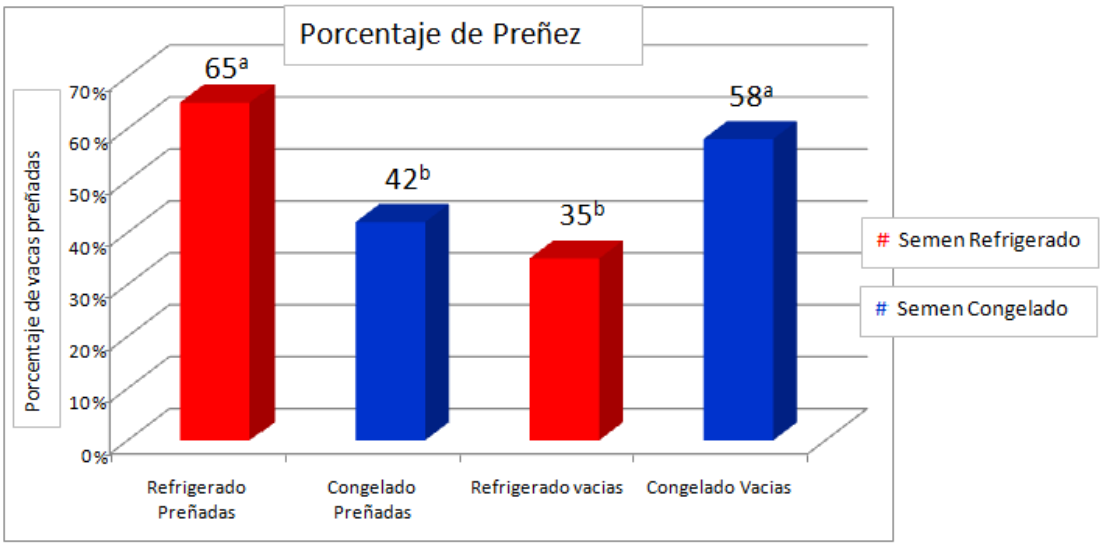
El análisis estadístico de preñez, motilidad individual, el porcentaje de células con cola doblada por el HOST, vivos y muertos y morfología espermática se realizó mediante test de Chi-Cuadrado, la motilidad espermática en distintos momentos se analizó mediante el test de ANOVA de dos vías para medidas repetidas en el tiempo, donde se determinó el efecto del tiempo, tratamiento y la interacción entre ambos. Dichos análisis se realizaron con RStudio (versión 2022.02.1+461). Se consideró que existe diferencia estadística cuando $p<0,05$.

RESULTADOS

Porcentaje de preñez

El porcentaje de preñez fue mayor para el grupo de SR comparado con el grupo de SC: 65% (32/49) vs 42% (20/48), respectivamente (p=0,03), según puede observarse en la Fig. 1.

Figura 1. Porcentaje de preñez de vaquillonas Wagyú inseminadas a tiempo fijo con semen congelado y semen refrigerado.



a y b son estadísticamente diferentes p< 0,05

Tabla 2. Diagnóstico de gestación de vaquillonas Wagyú a los 30 días luego de la IATF para los grupos con SC y SR. Se presentan los números de animales por grupo y los porcentajes

	Preñadas	No preñadas	Total P+NP	% de preñez
Semen Congelado (SC)	20	28	48	41,7ª
Semen Refrigerado (SR)	32	17	49	65,3ᵇ
Total inseminadas	52	45	97	53,5

a y b son estadísticamente diferentes p< 0,05

Resultados del estudio de parámetros seminales

Al observar la motilidad progresiva en microscopio óptico, se obtuvieron unos resultados de un 60% para SC de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme con dirección caudo cefálica vs. 80% para SR, como se observa en la tabla 3 (p=0,003). El resto de los espermatozoides presentaban movimiento en círculos u ondulatorio.
En el Test Hiposmótico (HOST), para el grupo SR hubo mayor proporción de colas enrolladas que rectas comparado con SC siendo p<0,05, como se muestra en la tabla 3.
Mediante la evaluación de la integridad de la membrana celular en base a la coloración de Eosina-Nigrosina, se obtuvo un resultado de 51,4% de espermatozoides con la membrana celular integra para SC vs. un 80,77% para SR, como se observa en la tabla 3.
Con relación a la evaluación de la morfología espermática, al principio los defectos se clasificaron según su localización en cabeza, pieza media y cola. Al encontrarse un porcentaje muy bajo, los defectos fueron anotados como espermatozoides sin defectos o espermatozoides con defectos (no se especificó el tipo de anomalía). Dando como resultados un 90% de espermatozoides sin defectos para el SC vs. 88% para SR (p>0,05), como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Tabla unificada de estudios de los parámetros seminales para SC y SR. Se registra el % de motilidad individual, el % de espermatozoides con membrana funcional (cola enrollada) evaluado mediante HOST, el % de espermatozoides con membrana alterada (evaluado por Eosina Nigrosina y el % de espermatozoides sin defectos.

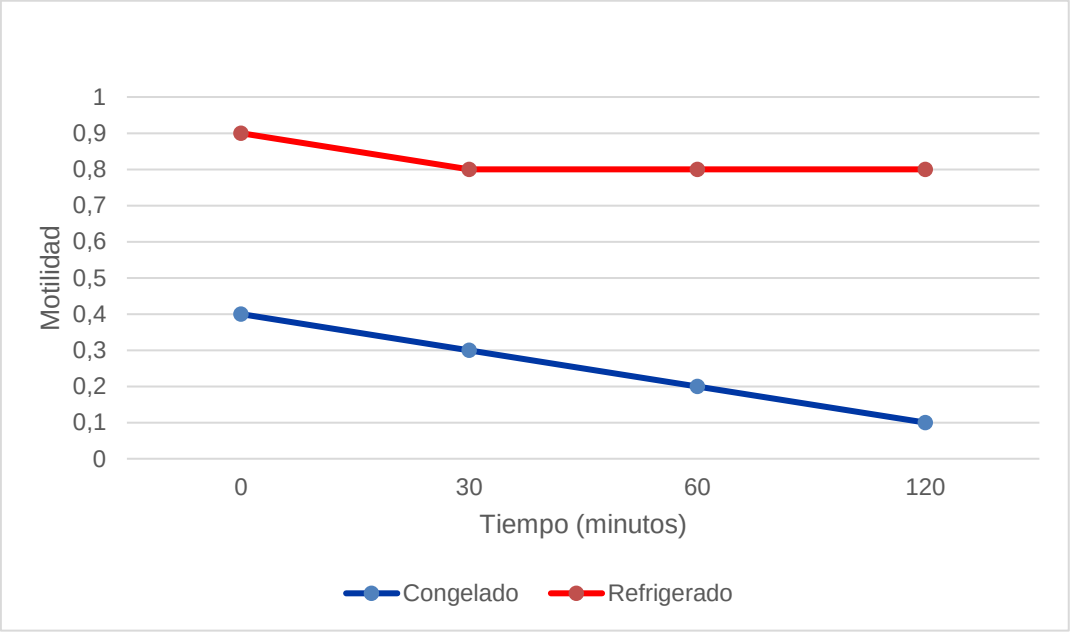
Tratamiento de semen	% Motilidad individual	% de espermatozoides con Cola enrollada (HOST)	% Vivos y muertos (Eosina Nigrosina)	Morfología Espermatozoides sin defectos
Semen Congelado (SC)	60%[a]	40%[a]	51,4%[a]	90 %
Semen Refrigerado (SR)	80%[b]	62%[b]	80,8%[**b**]	88 %

(a y b presentan diferencia significativa p<0,05).

Para la Morfología no se observó diferencia significativa. (p>0,05)

En el test de termorresistencia, la motilidad fue mayor para SR que para SC (p<0,05); hubo interacción entre tratamiento y tiempo teniendo mayor motilidad en cada tiempo SR sobre SC (p<0,05). Asimismo, se observó un efecto del tiempo para el grupo SC (p<0,05), siendo la motilidad menor en el tiempo 120 comparado con el tiempo 0; pero no se observó efecto del tiempo para SR (p>0,05), como se detalla en la Figura 2.

Figura 2. Test de termoresistencia en 4 tiempos en baño maría de 37°C para SC y SR en base de 100.



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se comparó el porcentaje de preñez obtenido en vaquillonas en un trabajo de IATF cuando fueron inseminadas tanto con SC como SR. Además, se realizó el espermiograma del SC y SR. Se tomaron los datos de un trabajo particular y los mismos se analizaron estadísticamente.

La utilización de semen refrigerado resultó en un mayor porcentaje de preñez a la Inseminación Artificial (P/IA) en un tratamiento de IATF, comparado con la utilización de semen congelado descongelado (65% vs 42%), lo cual coincide con los trabajos anteriormente citados (Borchardt et al., 2017; Borges et al., 2021; Bucher, 2009; Wiebke et al., 2023; Yang et al., 2018 sig.). Sin embargo, en Argentina, Felice et al. (2012) y Tríbulo et al. (2005) no encontraron diferencias significativas con la aplicación de semen refrigerado o congelado en un programa de IATF.

La razón de la diferencia significativa encontrada en este trabajo podría deberse a un fenómeno multicausal dentro de los que consideraremos el factor individual y la dosis inseminante.

Se considera como primer factor el efecto individual del toro relacionado al tratamiento (SR vs SC). Varios autores publicaron sobre variaciones individuales importantes en el comportamiento del semen frente a la congelación y refrigeración. Watson (1995) publicó que la cantidad y tipo de fosfolípidos de la membrana del espermatozoide puede variar entre los individuos y esto determina diferencias en el comportamiento de los toros a la criopreservación (efecto del toro). Borges et al., (2021) y Murphy et al. (2018) demostraron que diferentes toros presentan variaciones en el comportamiento según la forma de preservación del semen, donde algunos toros se comportan mejor cuando su semen es refrigerado que cuando es congelado, y viceversa. En el caso estudiado, la utilización del mismo toro podría haber incidido en los resultados, si fuera el caso que el toro tuviera pobre desempeño en la criopreservación y un mejor desempeño a la refrigeración.

En cuanto a la dosis inseminante, la cantidad de espermatozoides para cada pajuela fue fijada en 30 x 10^6 espermatozoides, tanto para el SR como para el SC. Si se combinan los parámetros de % de vivos y muertos, % de motilidad individual y cantidad total de espermatozoides, se puede afirmar que la dosis inseminante teórica (entendida como la cantidad de espermatozoides vivos y normales con movimiento rectilíneo uniforme) es mayor para el SR (30 x 10^6 x 0.8 x 0.8= 19.2 x 10^6 que para el SC (30x 10^6 x 0.6 x 0.5 = 9 x 10^6). En el SC, como se pierden más de la mitad de los espermatozoides, la dosis inseminante es menor y podría haber influido en la oferta de espermatozoides para la fertilización. A pesar de esto, los dos tipos de presentación (SR o SC) superaron ampliamente los mínimos recomendados. En este sentido, Bucher (2009) concluye que la reducción de la dosis inseminante hasta un 85% (de 20 x 10^6 a 3 x 10^6 espermatozoides), no produciría diferencias en los porcentajes de preñez utilizando protocolos de IATF y plantea que, a igual dosis, quizás el P/IA del SR fuera superior.

Por otra parte, Borges et al., (2016) utilizaron semen refrigerado (SR) comparándolo con semen congelado (SC) a la misma concentración de 25 x 10^6 y obtuvieron un 20% de aumento en el P/IA a favor del semen refrigerado lo que apoyaría los resultados de nuestro trabajo evaluado, en el que la mayor dosis inseminante para el SR, podría haber tenido el efecto de aumentar el porcentaje de preñez, explicando la diferencia observada.

Como la fertilidad no depende exclusivamente de las condiciones seminales, además se consideró condición corporal y tratamiento hormonal para estudiar si puede haber influido en el trabajo evaluado.

Con respecto a la condición corporal en el trabajo estudiado, se utilizaron vaquillonas de raza Wagyú, alimentadas a campo natural por silvopastoreo. Las condiciones de campo no fueron las más apropiadas, pues el estudio se desarrolló durante un período de sequía y la condición corporal era de media a media baja (CC 3.494 ± 0.33 [escala 1 a 8] con un peso en un rango de 287.71 ± 8.35 Kgs), no siendo la más adecuada, ya que la condición corporal en los reproductores es un factor fundamental para lograr la preñez. Además, no se encontraron trabajos que relacionen condición corporal baja en vaquillonas y comparen el uso de semen refrigerado y congelado. Sin embargo, existen trabajos en los que se recomienda un tratamiento hormonal diferente para

vaquillonas con alta o baja condición corporal en programas de IATF con semen congelado (Menchaca et al 2013). Como el trabajo evaluado por nosotras, se realizó con un protocolo hormonal recomendado para vaquillonas con baja condición corporal, la comparación de la utilización de SR con SC cobra una especial relevancia.

En condiciones de condición corporal media o baja, cabría suponer la existencia de cierta cantidad de ovulaciones retardadas que podrían afectar la fertilización cuando se insemina con semen congelado. La pulsatilidad o amplitud inadecuada de la secreción de GnRH en vaquillonas con baja condición corporal (o vacas con alta producción) podría eventualmente causar esta asincronía. Wiebke et al., (2023) encontró que, en vacas en producción, se producía hasta un 25% de ovulaciones atrasadas y la utilización de semen refrigerado mejoraba los porcentajes de preñez comparado con el semen congelado. Por otra parte, Felice et al., (2012), no observó diferencias en el uso de SR y SC a la IATF en vaquillonas. Este autor, además del Cipionato de estradiol como inductor de la ovulación, incluyó GnRH al momento de la IA lo que podría haber mejorado la sincronía de las ovulaciones eliminando las diferencias entre grupos de SR y SC. Una asincronía en las ovulaciones inducidas en el protocolo de IATF, podría provocar que los espermatozoides del semen congelado no estuvieran disponibles en el momento de la ovulación Esto sería debido a que las alteraciones sufridas en el proceso de criopreservación y su estado reactivo, disminuyen la vida de los espermatozoides en el tracto de la hembra. Bucher (2009), encontró que los espermatozoides que no son sometidos a procesos de criopreservación y descongelación tienen mayor sobrevida en el tracto genital de la hembra. Como consecuencia de ello el porcentaje de gestación para el semen congelado se podría ver afectado y no para el semen refrigerado.

Las propiedades fecundantes del semen congelado-descongelado fueron estudiadas por varios autores. Watson (1995) encontró que en el proceso de criopreservación, el daño se produce a varios niveles; a nivel de las membranas celulares, acrosoma, mitocondrias y cromatina. El daño afecta, por una parte, la motilidad de los espermatozoides disminuyendo velocidad y tipo de desplazamiento y la vitalidad de los espermatozoides causando la mortalidad de las células. Por otra parte, el stress oxidativo que produce cambios en el funcionamiento mitocondrial, afecta también su movimiento y durabilidad. Bucher (2009), encontró que los espermatozoides que no son sometidos a procesos de criopreservación y descongelación tienen mayor sobrevida en el tracto genital de la hembra. En la evaluación de la fertilidad del semen congelado, estos autores intentan predecir el comportamiento de un toro en base al análisis de su semen. Se aplican técnicas de evaluación que incluyen la observación de la motilidad en el tiempo, y aquellos cambios que puedan haber sucedido en la criopreservación. Existen publicaciones que sugieren que la integridad y función de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma, pueden ser consideradas variables de importancia y, por tanto, su evaluación conjunta (mediante HOST y tinciones dobles como azul de tripán-Giemsa), podrían usarse como pronóstico de la fertilidad potencial del semen en fertilización in vitro (IVF) o IA (Tartaglione & Ritta, 2004). Para Borges. et al. (2016) la mayor causa de pérdidas de espermatozoides durante la congelación resulta de lesiones en la membrana plasmática.

Es por ello que además de evaluar el porcentaje de gestación para SR y SC, se realizaron análisis seminales para los parámetros HOST, Termorresistencia, Motilidad individual y Test de vivos y muertos que era lo que se disponía con las condiciones a campo en que se trabajó. Estos análisis arrojaron diferencias significativas entre el SR y el SC que podrían explicar los resultados de preñez en combinación con los factores anteriormente mencionados.

Los parámetros de colas enrolladas (evaluados a través del test de hipoosmosis) que representa a los espermatozoides con membrana osmóticamente activa; el test de termorresistencia que mide la supervivencia de los espermatozoides a lo largo del tiempo (evaluado por el porcentaje de motilidad a lo largo del tiempo hasta las dos horas); el porcentaje de espermatozoides vivos (medidos en frotis con la coloración de eosina nigrosina) y el porcentaje de Motilidad Individual, todos estos parámetros demuestran que el semen refrigerado presenta mayor cantidad de espermatozoides vivos y mótiles lo que es lo mismo que decir que hay menos cantidad de espermatozoides dañados y con más y mejor motilidad. Esto es similar a lo publicado por Borges et al., (2016).

En el estudio de morfología espermática evaluada con microscopio óptico, la cantidad de espermatozoides con morfología defectuosa (anormales) fue similar para SR y SC. Este parámetro que evalúa las alteraciones del parénquima testicular o defectos en su maduración, no tiene por qué haberse visto modificado por un efecto de la criopreservación.

En el trabajo evaluado por nosotras, no se realizó ninguna evaluación para el acrosoma. El daño a nivel del acrosoma, denominado “falsa reacción acrosómica", ocurre debido a un pasaje de iones que desestabiliza la funcionalidad de la membrana. En el acrosoma, la proacrosina se puede convertir en acrosina, promoviendo la digestión de la matriz acrosomal y, por ende, la fusión de membranas. Esta situación de células con membrana desestabilizada y con acrosoma reactivo o parcialmente capacitado reduciría la vida de los espermatozoides (Borges et al., 2011). Además, la producción excesiva de metabolitos de oxígeno (stress oxidativo), se asocia con la disminución de la fertilidad durante el procesamiento del semen y es uno de los principales factores de la baja calidad del semen congelado (Borges et al., 2011).

La utilización de un único eyaculado permitió comparar los resultados de los dos tipos de procesamiento de semen, sin que influya la individualidad. El toro es probado en fertilidad y se sabe que se desempeñaba bien en la IA con semen congelado. No obstante, para un mejor análisis del uso del semen refrigerado sería necesario comparar, en el mismo establecimiento y con la misma metodología, otros toros, o bien repetir el uso del mismo toro en otros establecimientos.

Por lo tanto, el SR aumentó el porcentaje de preñez en vaquillonas sobre el uso del SC aceptando la hipótesis planteada.

El SR presenta mejores porcentajes de sobrevivencia y menor porcentaje de células dañadas, se avala por el 20 % de aumento relativo en el porcentaje de motilidad individual, 28% más de cantidad de espermatozoides vivos, 22% más

de espermatozoides con la membrana intacta y una permanencia del 80 % de motilidad a las 2 horas de incubación.

Se utilizó un protocolo de IATF estándar para vaquillonas con una condición corporal media baja con alguna variante frente a lo publicado en la bibliografía. El protocolo utilizado, en general, arrojó resultados similares a otras publicaciones. La CC de los dos grupos permaneció similar con un 3.494 ± 0.33 para ambos grupos y los dos grupos se manejaron en el mismo establecimiento y en las mismas condiciones de alimentación y localización en potrero. La condición corporal no se evaluó separadamente por grupo. Se consideró que como la distribución de las inseminaciones fue realizada al azar en el mismo grupo, la condición corporal no debería favorecer o influir negativamente en la fertilidad en ningún grupo específico. De haber existido un efecto protocolo, el mismo habría incidido para los dos tratamientos por igual. Sin embargo, se consideró la posibilidad de que las ovulaciones en vaquillonas sometidas a IATF, con condición corporal baja, pudieran presentar un grado de asincronía que justifique los resultados obtenidos; especialmente, considerando la mayor sobrevida de los espermatozoides para SR, lo que podría explicar el mayor porcentaje de gestación para esa forma de conservación de semen.

Las variables categoría, establecimiento y eyaculado, no se consideraron de importancia, ya que todos los animales fueron tratados en un mismo lote y seleccionados al azar.

En el caso de años en los que la condición corporal de las vaquillonas es regular o baja, la utilización de SR podría aportar una mejora del porcentaje de preñez para ese año. Utilizado como “objetivo de mejora”, el veterinario actuante podría tomar las decisiones adecuadas a los efectos de priorizar una mejora del porcentaje de preñez, sobre la intensidad de la selección genética. Esto podría aportar beneficios en ciertas condiciones ambientales y constituirse como una alternativa útil o herramienta de manejo. Además, permite, al aumentar la cantidad de dosis inseminantes, disminuir el número de eyaculados necesarios evitando la sobre exigencia del toro y el deterioro de su semen. Esto sería especialmente importante en el caso de contar con un alto número de hembras para inseminar, pues la dosis inseminante en el semen refrigerado se puede reducir hasta un 50%. También se facilita el manejo, aumentando la ventana de tiempo para inseminar, lo que podría ser de utilidad cuando la cantidad de animales es grande. Además, permite usar algunos reproductores cuyo semen no tiene buena respuesta a los procesos de congelación-descongelación.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se observó que con el SR se obtiene un mayor porcentaje de preñez en comparación con el SC, en vaquillonas con una CC 3.494 ± 0.33, con un rango de peso de 287.71 ± 8.35 Kgs, sometidas a un protocolo de IATF.

Esta diferencia pudo ser debida a un fenómeno multicausal en el que, entre otros factores, se destacan los mejores parámetros seminales encontrados para SR que tuvo como consecuencia el aumento de la dosis inseminante.

Se concluye que el uso de semen refrigerado es posible en establecimientos que utilizan su propio toro y utilizan un trabajo de IATF permitiendo obtener un mayor porcentaje de gestación a la primera IA y resultando en un mayor porcentaje de preñeces tempranas. Además, disminuye la cantidad de trabajo, no siendo necesaria la congelación del semen.

En el caso evaluado, la mejora en el porcentaje de gestación con el uso de SR permitió aumentar la preñez total, lo que contribuyó a brindar una mejora económica, en una temporada de servicios comprometida para el establecimiento por las condiciones climáticas adversas.

Implicaciones Prácticas

En nuestro país no existe un comercio específico de semen refrigerado. El semen podría ser provisto por toros nacionales provenientes de bancos de semen, o a partir de toros propios del establecimiento (siempre contando con el adecuado control sanitario). En función de las distancias en Uruguay y considerando la sobrevida del material seminal, sería posible conseguir las dosis de semen en cualquier parte del país y llevarlas a establecimientos preparados para la IATF.

La utilización de toros mejoradores es superior utilizando SR, ya que es posible utilizar menores cantidades de espermatozoides.

La reducción de la dosis inseminante podría significar una oportunidad para la utilización de semen sexado, dado los resultados encontrados para el SR en la utilización de microdosis. Si bien a la fecha no existe producción de semen sexado en Uruguay, teniendo en cuenta la duración de la fertilidad del SR, seríaposible realizar la distribución desde lugares cercanos (Argentina o Brasil), como alternativa para aumentar el uso de esta biotecnología.

La utilización de SR es una herramienta a tener en cuenta en trabajos de IATF en rodeos donde las condiciones de manejo no son las ideales, con largas jornadas de inseminación; o especialmente cuando la condición corporal de las vaquillonas, debido a condiciones climáticas, no son las adecuadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, E., García Suárez, F., & Sicilia, G. (2023). *Eficiencia técnica y adopción de tecnologías en la ganadería vacuna en Uruguay* (Documento de trabajo 01/23). Facultad de Ciencias Sociales, UDELAR.

Alvez, A.C. (2019). *Efecto del crecimiento y desarrollo sobre los perfiles endócrinos, estructuras ováricas y fertilidad den vacas adultas* [Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, UDELAR]. Biblioteca digital veterinaria. https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/handle/123456789/2607

Aragunde, L.C., CarlevaroCastella, C.H.,& Saravia, L.A. (1954). Inseminación artificial en vacunos del Uruguay. *Anales de la Facultad de Veterinaria del Uruguay, 6*(2), 23-37.

Arruda, R.P., Barnabé, V.H., Alencar, M.M.,& Barnabé, R.C. (1992). Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,29*(1), 131-137.

Ballachey, B.E., Evenson, D.P., & Saacket, R.C. (1988). The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *Journal of Andrology 9*(29), 109-115.

Bertino, M., & Tajam, H. (2000). *La ganadería en el Uruguay 1911 a 1943*. Instituto de Economía, IECON.https://www.iecon.fcea.udelar.edu.uy/en/publications/iecon-production/item/dt-03-00-la-ganaderia-en-el-uruguay-1911-1943.html.

Bó, G.A., Huguenine, E., & Menchaca, A. (2014). Control Farmacológico del ciclo estral para IATF en vacas de cría: estado del arte. *Jornadas Taurus de Reproducción Bovina,7*, 76-94. https://fcvinta.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/06/horarios-de-iatf.pdf

Borchardt, S., Schüller L., Wolf, L., Wesenauer, C., & Heuwieser W. (2017). Comparison of pregnancy outcomes using either an Ovsynch or a Cosynch protocol for the first timed AI with liquid or frozen semen in lactating dairy cows. *Theriogenology,107,* 21-26.

Borges, J.C., Silva, M.R., Guimarães, J.D., Esper, C.R., & Franceschini, P.H. (2011). Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal, 35*(3), 303-314.

Borges, J.C., Silva, M., Marinho, D., Nogueira, E., Sampaio, D.,Oliveira, L., Abreu, U., Mourão, G., & Sartori, R. (2016). Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reproduction, FertilityandDevelopment,28*, 1004-1008.

Borges, J., Silva, M., Silva, R., Massoneto, J., Loro P., Alves, I., Nogueira, E., Nicacio, A., Oliveira, L., & Abreu, U. (2021). *Sêmen refrigerado bovino em protocolos de IATF, o que sabemos até o*

*momento?*https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/219884/1/Semen-IATF-2020-Doc166.pdf

Bucher, A. (2009). Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cow. *Theriogenology*,*71*, 1180-1185.

Castelo, T., Frota, T., & Silva, A. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta VeterinariaBrasilica,2*(3), 67-75.

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

Cavestany, D. (2005). Manejo reproductivo en vacas de leche. ¿Producir o no producir? *Revista INIA,* (4). http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/revista/2005/119.pdf

Cavestany, D., & Méndez, J. (1993). Manual de Inseminación Artificial en bovinos. *Boletín de divulgación INIA* (39), http://inia.uy/en/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219240807155445.pdf

Cenariu, M., Páll, E., Borzan, M., Bogdan, L.,& Groza, I. (2018). Advanced Techniques of Bovine Semen Analysis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, *75*(1), 58. https://doi:10.15835/buasvmcn-vm:004317

Clarke, R., & Johnson, L. (1987). Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova in vitro. *GameteResearch, 16*(3), 193-204.

Crepaldi, G.A. (2023). *Desenvolvimento do uso de semensexado refrigerado na IATF de vacas de corte* [Tesis de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo]. Digital Library USP. https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-01082023-165616/publico/Gabriel_Armond_Crepaldi_original.pdf

Curbelo, M., & Rodríguez, Z. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay* [Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UDELAR]. Colibri. https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/2730?mode=ful

De Nava Silva, G.T. (2004). Resultados en programas de Inseminación Artificial de vacunos implementados durante la temporada 2003/2004 en estancias ganaderas comerciales en Uruguay. En Centro Médico Veterinario Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. 33, pp.61-66). CMVP.

De Nava Silva, G.T. (2011). Reproducción en los rodeos de cría pastoriles: el enfoque de un veterinario de campo. Centro Médico Veterinario Paysandú (Ed.), *Congreso Latinoamericano de Buiatría; Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. 29, pp. 68-77). CMVP.

De Nava Silva, G.T. (2013). Breve historia de la inseminación artificial en Vacunos. En *Reproducción bovina aplicada: desarrollo y validación de programas de inseminación a tiempo fijo en Uruguay* (pp.18-25). Hemisferio Sur.

De Nava Silva, G.T., & Rodríguez Sabarrós, M. (1995). Bases para la evaluación de la performance reproductiva de los rodeos de cría manejados en condiciones de pastoreo*. Revista Veterinaria, 31*(127), 19-24.

Durán del Campo, A. (2001). Historia de la inseminación artificial en vacunos en Uruguay. *Veterinaria, 36,* 5–23. https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/1286/900

Elhordoy, D. (2017). *Manual Teórico-Práctico de Inseminación artificial en vacas*. Departamento de Reproducción Animal. Facultad de Veterinaria, UDELAR.

Felice, A., Rodríguez Aguilar, S., Vater, A.,& Cabodevila, J. (2012). Inseminación artificial a tiempo fijo: comparación del porcentaje de preñez obtenido utilizando semen refrigerado vs congelado/descongelado. En Centro Médico Veterinario Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría*(Vol. 40, p. 193). CMVP.https://centromedicoveterinariopaysandu.com/wp-content/uploads/2015/06/Felice-et-al.-INSEMINACION-ARTIFICIAL-A-TIEMPO-FIJO-COMPORACION-DEL-PORCENTAJE-DE-PRE%C3%91EZ.-2012.pdf.

Fernández, A., Gonzalvo López M.C., ClaveroGilabert, A., Ruiz de Assín, R., Zamora, S., Roldán, M., Rabelo, B., Ramírez, J.P., Chaur, A.Y., & Castilla, J.A. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR*,*14*, 1. https://revista.asebir.com/fundamentos-de-criobiologia-espermatica-para-bancos-de-semen/

Fleitas, A., Bonifacino, L., Aragunde, M., Ferraris, A., & Carbo, A. (1976). Fecundidad del semen congelado en pellets por el Test de termorresistencia. *Veterinaria,12*(62), 117- 122.

Foote, R.H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science, 80*(2), 1-10.

Giraldo, J.J. (2007). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación, 4*(1), 51-57.

Guarino, H., D'Anatro, N., Bañales, P., Fernández, L., González, G., & Bailón, M. (2004). Control de la calidad sanitaria y biológica del semen bovino congelado. EnCentro Médico VeterinarioPaysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría*, (Vol. 32, pp.214-216). CMVP.

Hidalgo, C.O., Tamargo Miguel, C., & DíezMonforte, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecnología agroalimentaria*, *2*, 39-43.

Huanca, W. (2013). Alternativas para mejorar el comportamiento reproductivo en ganado bovino cruzado (Bostaurus x Bosindicus). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 21*(3), 181-183.

Hudiatma, M.D., Prasetiyo, D., Haryani, E., Pujianto, J. Kuswati, K., Yekti, A., & Susilawati, T. (2020). The success rate of artificial insemination using liquid semen with different diluents in Bali cattle. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences, 100*, 45-50.

Instituto Nacional de la Leche. (2019). *Encuesta Lechera 2019: Resultadosdefinitivos.*https://www.inale.org/estadisticas/encuesta-lechera-2019-resultados-definitivos.

Instituto de Nacional de Investigación Agropecuaria. (2022). *XX Taller de evaluación de los diagnósticos de gestación vacuna.* http://inia.uy/estaciones-experimentales/direcciones-regionales/inia-treinta-y-tres/XX-Taller-de-evaluacion-de-los-diagnosticos-de-gestacion-vacuna

Jaime, D. (2004). *Inseminación Artificial en Vacunos*. http://www.inia.org.uy/prado/2004/inseminacionartificial.htm.

Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., & Zaneveld, L.J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility, 70*(1), 219-28.

Lemaire, C., Grela, C., De María, P., & Cavestany, D. (2011). Indicadores reproductivos en predios lecheros en Uruguay: Resultados de dos años de evaluación. *Veterinaria, 47*(184), 17-21.

Lemma, A. (2011). Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. *Artificial Insemination in FarmAnimals*, *12*, 191-216.

Lopepe, H. E. (2015). *Comparación entre el uso de semen fresco versus congelado en programas de IATF* [Trabajo Final inédita para optar al Grado Académico de Especialista en Reproducción Bovina]. Universidad Nacional de Córdoba.

Marcantonio, S. (2006). Cinco consideraciones para un mejor almacenamiento del semen congelado. *Hereford, 72*(640), 60-61. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/45-mantenimiento_semen_congelado.pdf

Menchaca, A., Núñez, R., De Castro, T., García Pintos, C.,& Cuadro, F. (2013). Implementación de programas de IATF en rodeos de cría. *Seminario de actualización técnica: Cría Vacuna INIA*, 208, 229-246.

Mendez, J. Vizcarra, J.,& Orcasberro, R. (1988). Condición por apreciación visual en vacas Hereford. *Revista Plan Agropecuario, 44*, 33-34. https://www.planagropecuario.org.uy/web/44/revistas/julio-1988-n%C2%B044.html

Morrell, J.M. (2011). Artificial insemination: current and future trends. Manafi, M. (Ed.), *Artificial insemination in farm animals* (pp. 1-14). IntechOpen.

Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J.L., López, M., Fernández, A., & Peña, A.I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *Información Técnica Económica Agraria, 101*(3), 175-191.

Murphy, E., O'Meara, C., Eivers, B.,Lonergan, P.,& Fair, S. (2018). Optimizing storage temperature of liquid bovine semen diluted in INRA96. *Journal of DairyScience, 101*(6), 5549-5558.

Noakes, D. E., & Parkinson, T. J. (2001). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*(8ªed.). Saunders.

Palma, G. (2008). Biotecnología de la reproducción. Ciencia, Tecnología y Sociedad. En *Biotecnología de la reproducción* (2° ed., pp. 1-49). https://www.researchgate.net/publication/281841588_BIOTECNOLOGIA_DE_LA_REPRODUCCION_CIENCIA_TECNOLOGIA_Y_SOCIEDAD

Papa, P., Maziero, R., Guasti, P., Junqueira, C., Freitas, C., Papa, F.O., Vianna, F., Alvarenga, M., Crespilho, A.,& Dell'Aqua, J. (2014). Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, *83*, 107-113.

Polge, C., & Rowson, L.E.A. (1952). Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C. *Nature*, *169*, 626-627.

Pursley, J.R., Mee, M.O., & Wiltbank, M.C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology*, *44*(7), 915-23.

Roberts, S.J. (1979). *Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción: Teriogenología*. Editorial Hemisferio Sur.

Roche, J.F., &Diskin, M.G (2005). Efecto de la nutrición sobre la eficiencia reproductiva de los bovinos. EnCentro Médico VeterinarioPaysandú (Ed.). *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. 33, pp. 21-26).https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/handle/123456789/333

Rodríguez Irazoqui, M. (2008). *Manejos farmacológicos y su relación con el momento de la ovulación en programas de inducción/sincronización de celos e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en vacas de carne* [Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UDELAR]. https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/handle/123456789/2673

Sánchez, A., Rubilar, J., & Gatica, R. (2002). Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Archivos de MedicinaVeterinaria*, *34*(1), 131-134.

Senger, P.L. (2005). Endocrinology of the Male and Spermatogenesis (Further Phenomena for Fertility). En *Pathways to pregnancy and parturition* (2ª ed. revised, pp. 238-239). Current Conceptions.

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.

Tippenhauer, C.M., Plenio, J.L., Madureira, A.M.L., Cerri, R.L.A, Heuwieser, W., & Borchardt, S. (2021). Timing of artificial insemination using fresh or frozen semen after automated activity monitoring of estrus in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science, 104*(3), 3585-3595.

Thibier M., Wagner H.G. (2002) World statistics for artificial insemination in cattle. Theriogenology, 74(2), 203-212.

Thomas, C.A., Garner, D.L., DeJarnette, J.M., & Marshall, C.E. (1998) Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction, 58*, 786-793.

Thomasset, C.W. (2007). Historia de la primera fecundación artificial en Uruguay. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria,8*(1), 1-7.

Tríbulo, H., Brogliatti, G., Coronel, C., Alisio, L., Balla., E., Tríbulo, R., Avilés, M., Miranda, S., Quaranta, G., Ponzio, P.,& Vincenti, L. (2005). Efecto del semen refrigerado vs congelado sobre el porcentaje de preñez en protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo en vaquillonas. En *Resúmenes delVI Simposio Internacional de Reproducción Animal* (pp.466). IRAC.

Verberckmoes, S., Soom, A., Dewulf, J., & Kruif, A. (2005). Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, *63*(3), 912-922.

Vincent, P., Underwood, S.L., Dolbec, C. & Bouch, N. (2012). Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction, 9*(3), 153-165.

Viotti, G. (2011). Procesamiento de semen bovino para inseminación artificial [Trabajo de pregrado, Facultad de Veterinaria, UDELAR]. Colibri. https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19819/1/FV-29377.pdf

Wassarman, P. (1999). Mammalian Fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. Review. *Cell, 96*, 175-183.

Watson, P.F. (1995). Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development, 7*, 871-891.

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen *Animal Reproduction Science, 60*(2), 481-492.

Wiebke, M., Pieper, L., Gürler, H., Janowitz, U., Jung, M., & Schulze, M. (2023). Effect of using liquid semen on fertility in German Holstein Friesian dairy cattle: A randomized controlled clinical trial. *Theriogenology,15*(199), 50-56.

Williams, S. (2013). Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas. *RevistaBrasileira de Reprodução Animal, 37*(2), 207-212.

Yanagimachi, R. (2022). Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics. *Biology of Reproduction*,*106*(4), 644-675.

Yang, D.H., Standley, N.T., & Xu, Z. (2018). Application of liquid semen technology under the seasonal dairy production system in New Zealand. *Animal Reproduction Science*, *194*, 2-10.

Yekti, A.P., Kusumawati, E.D., Kuswati, K., Ridhowi, A., Sudarwati, H., Isnaini, N., & Susilawati, T. (2018). Succesfull of artificial insemination by using chilled semen on brahman cross cows. https://www.researchgate.net/publication/323711554_Succesfull_of_Artificial_Insemination_by_Using_Chilled_Semen_on_Brahman_Cross_Cows