



UBA
Universidad de Buenos Aires



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires



“Predicción de la Eficiencia de Dosis Seminales Bovinas en Inseminación Artificial a Tiempo Fijo”

Maestrando: Esp M.V. Dante Cerutti
Director: Prof. Dr. Humberto O. Cisale

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam.

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE “MAGISTER DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN REPRODUCCIÓN ANIMAL”**

2019

DEDICATORIAS

A mis padres por darme la vida e inculcarme la cultura del esfuerzo y la perseverancia.

A Bettina mi compañera de la vida por su apoyo y colaboración incondicional

A mis hijos Benjamín, Joaquín y Máximo por el tiempo prestado.

AGRADECIMIENTOS

A mi colega Melina Castillo por su incondicional apoyo en la ejecución del trabajo.

Al Dr. Guillermo Meglia, amigo que me regaló la vida, siempre aportando sus consejos y espacios de trabajo para facilitar la concreción de este objetivo.

A los compañeros de la Cátedra de Reproducción Animal por ocuparse de mis tareas docentes durante mis ausencias para el cursado de esta maestría.

A la facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam, por permitirme realizar los trabajos de esta tesis.

A los alumnos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam, que colaboraron en la ejecución de las tareas a campo.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA por la dedicación que ponen en sus tareas hacia los maestrandos y que valoro especialmente.

Especialmente a mi Director, el Dr. Humberto Cisale, por su paciencia y tiempo, no solo por su labor específica sino por su integridad como persona y docente, brindándome todas las posibilidades de concretar este objetivo.

ÍNDICE TEMÁTICO

DEDICATORIAS	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE TEMÁTICO	4
INDICE DE TRABLAS Y GRAFICOS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
Hipotesis General.....	15
Objetivos Particulares.....	15
DISEÑO EXPERIMENTAL	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Semen Congelado.....	17
Descongelado del Semen.....	18
Evaluación de Motilidad Espermática	19
Evaluación de Relación Vivos/Muertos.....	20
Evaluación de Integridad Acrosómica.....	20
Test de Endósmosis.....	22
Test de Resistencia Osmótica.....	23
IATF.....	24
Diagnóstico de Preñez.....	27
Método Estadístico.....	28
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	37

BIBLIOGRAFÍA	38
APÉNDICE.....	43

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

TABLAS

Tabla 1	32
Tabla 2	32
Tabla 3	43
Tabla 4	43

GRÁFICOS

Gráfico 1	29
Gráfico 2	29
Gráfico 3	30
Gráfico 4	30
Gráfico 5	31
Gráfico 6	31
Gráfico 7	32

RESUMEN

La técnica de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una biotecnología de alto impacto en la mejora genética en rodeos de cría en zonas marginales productoras de terneros de la República Argentina. Para el éxito de la misma uno de los factores a tener en cuenta es la calidad del semen que llega a los lugares de aplicación de la IATF. Para evaluar la capacidad fecundante del semen a utilizar se dispone de laboratorios con un nivel básico de equipamiento. Es importante contar con técnicas de evaluación predictivas de la eficiencia a campo de las dosis seminales lo más precisas posibles. En el presente trabajo se utilizaron tres lotes de vacas británicas de 108, 84 y 50 vacas, y se comparó motilidad espermática, integridad acrosómica, test de resistencia osmótica, test de endósmosis, relación vivos/muertos y porcentaje de preñez del semen utilizado sometido a dos protocolos de descongelado. El resultado indica que la incorporación del test de endósmosis es una opción válida, de bajo costo, objetiva y de fácil aplicación en laboratorios con baja complejidad para la evaluar la capacidad fecundante del semen bovino en un programa de inseminación artificial a tiempo fijo.

Palabras Claves: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, Capacidad Fecundante del Semen, Test de Endósmosis.

ABSTRACT

Fixed-time artificial insemination (FTAI) technique is a high impact genetic improvement biotechnology applied in beef herds bred in marginal areas of Argentina. For the success of it, one of the factors to take into account is the quality of the semen that reaches the places of application of the FTAI biotechnology. Nevertheless, to evaluate the fertilizing capacity of the semen to be used, only laboratories with a basic level of equipment are available. On the other hand, it is important to have predictive evaluation techniques, as accurate as possible, of the field behavior of the seminal doses. Three lots of 108, 94 and 50 British breed beef cows were used, and sperm motility, acrosome integrity, osmotic resistance test, endosmosis test, live/dead relationship and percentage of pregnancy of the semen used were compared under two thawing protocols. The result pointed out that the endosmosis test is a valid, low cost, objective and easy in laboratories with low complexity to evaluate the fertilizing capacity of bovine semen in a fixed-time artificial insemination program. Keywords: fixed-time artificial insemination, semen fertilizing capacity, endosmosis test.

ABREVIATURAS

AN: Acrosomas Normales

HOST: Test de Endósmosis

IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo

ME: Motilidad Espermática

ORT: Test de Resistencia Osmótica

BE: Benzoato de Estradiol

CE: Cipionato de Estradiol

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial con semen congelado es una biotecnología reproductiva aplicada masivamente en la especie bovina. Con la implementación de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) se optimizó su aplicación mejorando aspectos operativos y económicos (Edwards, 2015). En la República Argentina (según datos de la Cámara Argentina de Biotecnología de la Reproducción e Inseminación Artificial) se pasó de comercializar 589.347 dosis de semen de razas productoras de carne en el año 2001 a 3.406.904 en el año 2016, lo que por un lado muestra el crecimiento que se produjo en la aplicación de la técnica de Inseminación Artificial en Bovinos en los últimos años y por el otro, permite inferir que se inseminan entre dos y medio y tres millones de vacas productoras de carne. Existen variados factores que afectan el éxito de una Inseminación Artificial a Tiempo Fijo siendo el uso de semen de capacidad fecundante óptima un factor que requiere evaluaciones precisas y confiables (Bó, 2008). Si bien hay disponibilidad de estudios complejos para predecir la capacidad fecundante de una dosis seminal (Kathiravan, 2008; Bernardi, 2011; Veloz, 2017), los parámetros que se pueden evaluar en laboratorios de baja complejidad como los disponibles en zonas marginales (motilidad progresiva, morfología, porcentaje de espermatozoides vivos, y porcentaje de acrosomas normales), en general valoran la morfología y estructura de los espermatozoides, limitando solo la evaluación fisiológica a la motilidad espermática medida en forma subjetiva. Por otro lado, a esta última se la considera como un parámetro válido para la evaluación de la capacidad fecundante del semen, probablemente por la facilidad de su implementación; no obstante hay trabajos (Vera, 2003; Denise, 2018) que lo descartan como un buen predictor de esa capacidad. En estos mismos laboratorios comúnmente se utilizan pruebas que evalúan la integridad estructural de los espermatozoides de una muestra de semen (Tartaglione, 2004).

Si bien las curvas térmicas del proceso de congelado y descongelado han sido ampliamente estudiadas (Pickett, 1978; Parks, 1992; Watson, 2004), las alteraciones producidas en la membrana plasmática y el acrosoma del espermatozoide durante el proceso (Rubio-Guillén y Quintero-Moreno, 2009 ;

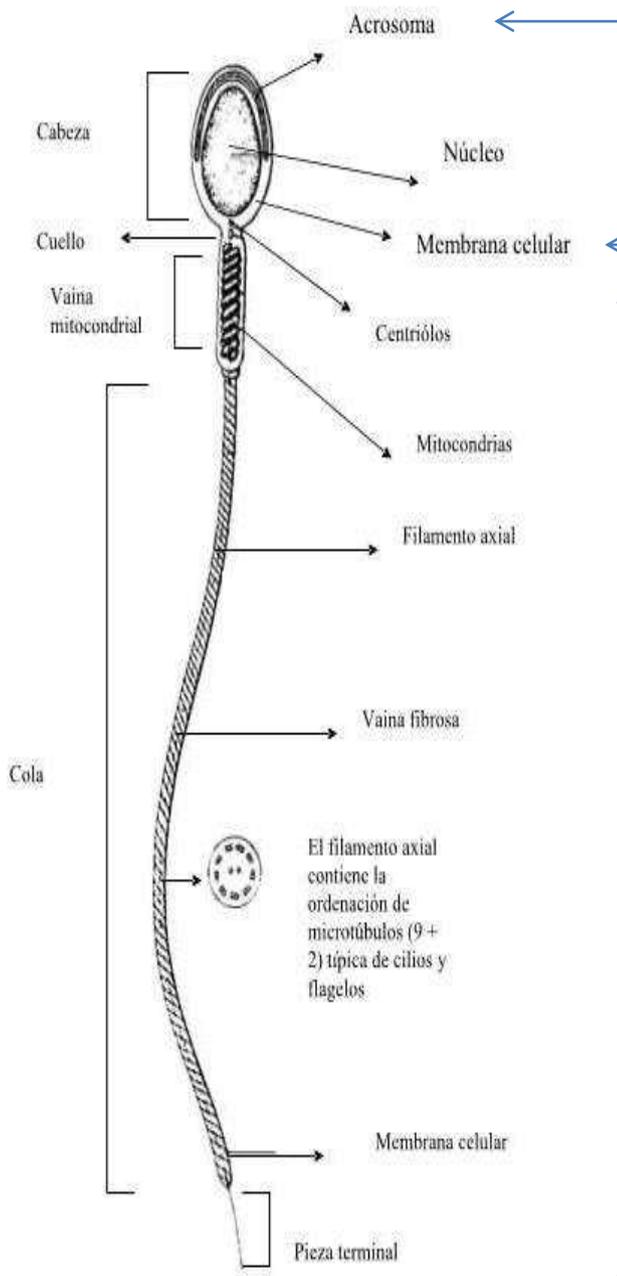
Buranaamnuaya, 2016) pueden afectar la fecundación del ovocito, ya que para un proceso apropiado se requiere una membrana plasmática intacta y bioquímicamente funcional, y un acrosoma conteniendo las enzimas hidrolíticas necesarias para atravesar la zona pelúcida. Distintos trabajos determinaron cómo se afectan las estructuras espermáticas en el proceso congelado/descongelado (Parks, 1992; Watson, 1995; Madrid, 2004; Tartaglione, 2004; Rubio, 2006;). Bernardi et al. (2011) encontraron que variaciones en las temperaturas de descongelado alteran la membrana plasmática y el acrosoma, determinando estas anomalías por métodos simples como el test de endósmosis para membrana plasmática y la integridad del acrosoma mediante microscopía de contraste de fase. No obstante, este trabajo no se relacionó con la fertilidad a campo del semen utilizado.

Por otro lado, Rubio-Guillén y Quintero-Moreno(2009), determinaron que el daño provocado en el proceso de congelado/descongelado es distinto en la membrana plasmática y en la membrana acrosomal. De esto surge la necesidad de evaluar estas estructuras por separado, y con métodos posibles de aplicar en laboratorios de baja complejidad a fin de extender su utilidad.

La valoración de la integridad funcional de las membranas plasmática y del acrosoma puede ser fácilmente determinada usando pruebas cuyo fundamento es analizar su reacción cuando se las expone a soluciones hipo-osmóticas (Parks, 1992; Rota, 2000; Tartaglione, 2004). Jeyendran et al. (1984) observaron una alta correlación entre la respuesta del espermatozoide a un medio hiposmótico y su capacidad de penetración en ovocitos de hámster desnudos. Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno se destacan dos: el test de endósmosis o hiposmótico (HOST) y el test de resistencia osmótica (ORT). La primera, denominada HOST por sus siglas en inglés “Hypoosmotic Swelling Test” se basa en el concepto fisiológico de la semipermeabilidad de las membranas plasmáticas intactas y bioquímicamente activas de las células vivas, las cuales permiten el paso de agua, buscando el equilibrio osmótico, cuando son expuestas a una solución hiposmótica (Rota, 2000; Tartaglione, 2004). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Esto permite que en los espermatozoides funcionalmente normales se produzca la captación selectiva de agua, alcanzándose así un

equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular que provoca cambios morfológicos apreciables (Madrid, 2004; Tartaglione, 2004). En el caso de la ORT se evalúa el daño provocado en la integridad de la membrana de los acrosomas cuando son sometidos a un medio hipoosmótico, revelando defectos de membrana que son observables en un microscopio de campo claro y bajo contraste de fase.

La Inseminación Artificial a Tiempo Fijo es una tecnología que se ha difundido en las regiones productoras de terneros de la República Argentina, que requiere una inversión importante en honorarios profesionales, dispositivos intravaginales, hormonas y semen. Muestra alto impacto productivo disminuyendo el costo por ternero logrado (Edward, 2015) y evitando la detección de celo (Bó, 2002), permitiendo incorporar genética a través de la técnica de inseminación artificial en zonas en las cuáles durante los últimos 50 años no se había podido aplicar por razones geográficas, de infraestructura y acceso. En condiciones de campo en zonas marginales, generalmente alejadas de centros urbanos y con oferta de laboratorios de complejidad limitada, se aplica esta tecnología sin tener una evaluación del semen a utilizar, o utilizando técnicas morfológicas que muestran los defectos solamente cuando la injuria es sumamente notable (Rota, 2000).



Integridad Acrosómica
Test de Resistencia Osmótica

Relación Vivos/Muertos
Test de Endósmosis

Motilidad Espermática

ESTRUCTURA ESPERMÁTICA EVALUADA POR CADA PARÁMETRO

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Establecer la utilidad de dos pruebas de evaluación de integridad funcional de membranas y compararlas con la capacidad fecundante del semen a campo, puede ser una herramienta de alto impacto en la valoración de muestras seminales para los laboratorios de baja disponibilidad tecnológica. Para verificar la utilidad de estas pruebas funcionales se diseñó un experimento comparando la evaluación de estos parámetros en un laboratorio de baja complejidad con la capacidad fecundante del semen en un programa de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

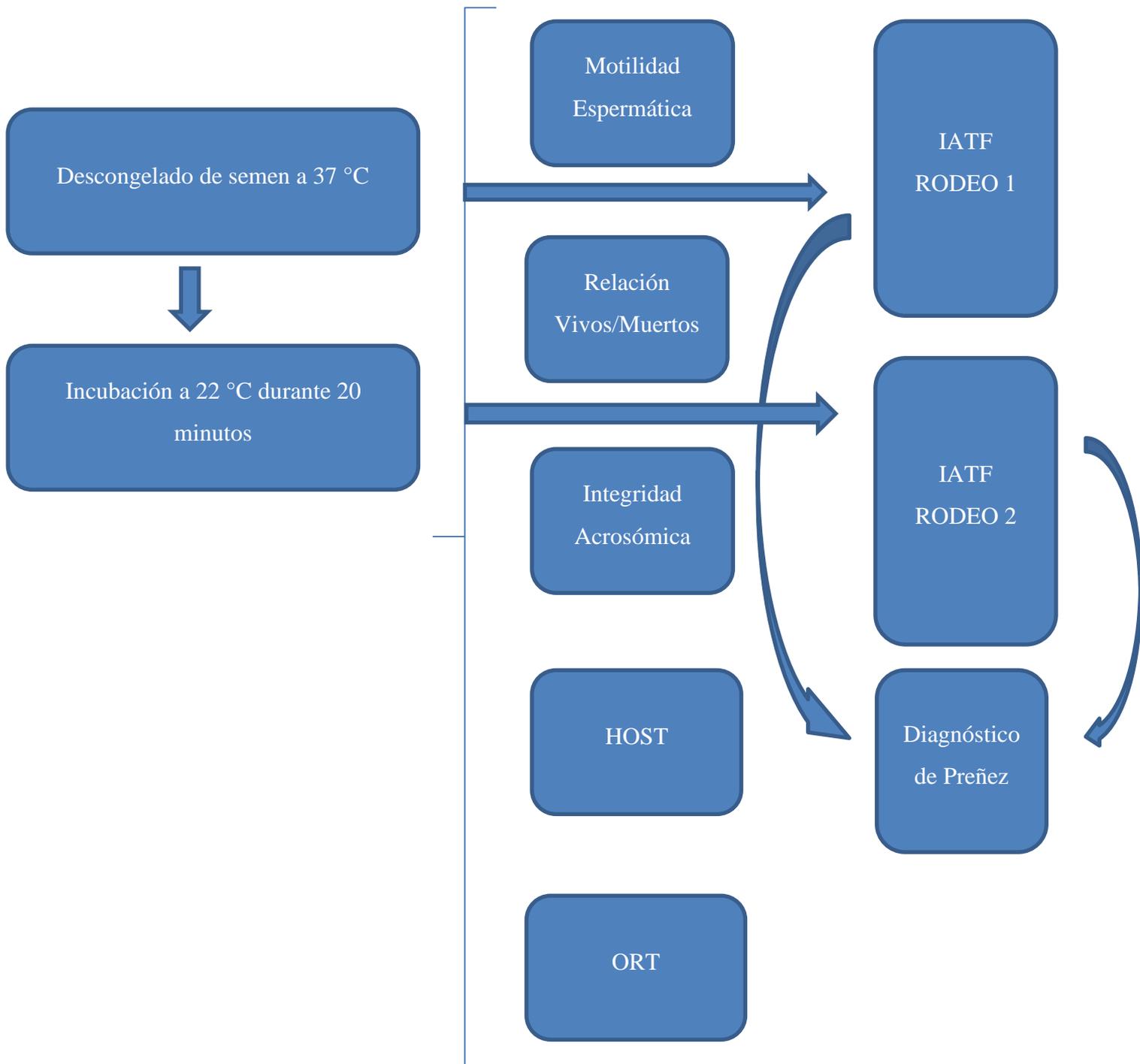
Hipótesis General

El Test de Endósmosis y Test de Resistencia Osmótica son útiles en la predicción de la capacidad fecundante *in vivo* del semen bovino congelado, utilizado en un protocolo de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en rodeos de cría en zonas semiáridas.

Objetivos Particulares

Determinar la asociación del Test de Resistencia Osmótica, el Test de Endósmosis, la relación vivos/muertos, la integridad acrosómica y la motilidad espermática con el porcentaje de preñez a campo del semen congelado.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Semen Congelado

Se utilizó semen de tres toros de raza Angus negro, congelado en pajuelas de 0,5 ml, obtenido de centros de inseminación artificial dedicados a la producción comercial de dosis seminales bovinas. Las muestras fueron evaluadas antes de su uso, determinándose motilidad espermática, integridad acrosómica, relación vivos/muertos, respuesta al Test de Endósmosis (HOST) y al Test de Resistencia Osmótica (ORT). Los toros fueron identificados como (R), (RM) y (M).



Equipamiento básico para la ejecución de los trabajos de laboratorio



Baño termostático con los medios para ejecución de los experimentos



Platina térmica conteniendo materiales para el inicio del trabajo de coloración vivos/muertos



Microscopio de contraste de fase para la ejecución de las distintas pruebas de laboratorio

Descongelado del Semen

Las pajuelas se descongelaron a baño maría durante un minuto a una temperatura de 37 °C y se dividieron en dos grupos. Un grupo se inseminó inmediatamente luego de extraído del termo de descongelado y se lo identificó como CONTROL y el otro grupo, considerado grupo TRATAMIENTO se mantuvo por 20 minutos en baño maría a una temperatura de 22 °C antes de realizar la inseminación artificial, tomando como base el trabajo de Bernardi y col. (2011).



Termo de nitrógeno líquido conteniendo las dosis seminales utilizadas en el trabajo a campo y laboratorio.



Termos de descongelado de las dosis seminales para los dos protocolos de trabajo.

Evaluación de Motilidad Espermática

Se colocó una muestra de 10 microlitros de semen entre cubre y porta objetos atemperados a 37 °C, evaluando con microscopio Leica DM 2000, con contraste de fase a 400 aumentos. Se consideró positivo a los espermatozoides que tuvieron motilidad progresiva (determinación subjetiva). El resultado se expresó en porcentaje de células móviles.

Evaluación de la Relación Vivos/Muertos (V/M)

Se coloreó un extendido de 10 microlitros de semen con 10 microlitros de Nigrosina-Nigrosina en solución acuosa y se evaluó a 1000 aumentos con microscopio Leica DM 2000 de contraste de fase. Se contaron un total de 200 espermatozoides, considerándose como muertos a los teñidos con Eosina (color rojo). El resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides vivos (Swanson y Bearden, 1951).



Espermatozoides muertos teñidos con Eosina

Evaluación de la Integridad Acrosómica (AN)

Se diluyó el semen en una proporción 1/100 en solución fisiológica formolada (0.3 %), evaluando mediante microscopio Leica DM 2000 con contraste de fase a 1000 aumentos. Se contaron 200 espermatozoides, considerándose como “anormal” los espermatozoides que mostraron falta total del capuchón acrosómico, pérdida del acrosoma en distintas proporciones o alteración del borde apical. El resultado final se expresó en porcentaje, e indica la proporción de acrosomas normales. (Bernardi, 2011).



A: espermatozoide con pérdida parcial de acrosoma. B Espermatozoide normal



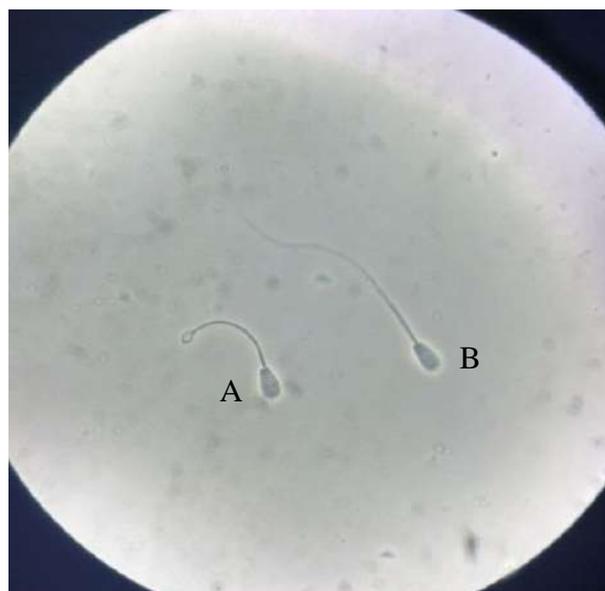
A: espermatozoide con pérdida parcial de acrosoma B: espermatozoide normal



Espermatozoide con pérdida parcial de acrosoma

Test de Endósmosis (HOST)

El HOST se realizó sometiendo una muestra de 10 μL de semen descongelado a un medio hiposmótico (100 mOsm/L - citrato de sodio 0.49 % y fructosa 0.9 %) durante 30 minutos y en un baño maría termoestable a 37°C. Transcurrido este tiempo, se inmovilizaron los espermatozoides con solución hipoosmótica formolada, se realizó un extendido y se observó en un microscopio de contraste de fase a 1000 aumentos, contando 200 espermatozoides. Los espermatozoides con cola enrollada total, parcialmente, o simplemente acodada se consideraron vivos (reaccionados) y el resultado final se expresó en porcentaje de espermatozoides reaccionados (Rubio-Guillén y Quintero-Moreno, 2009)



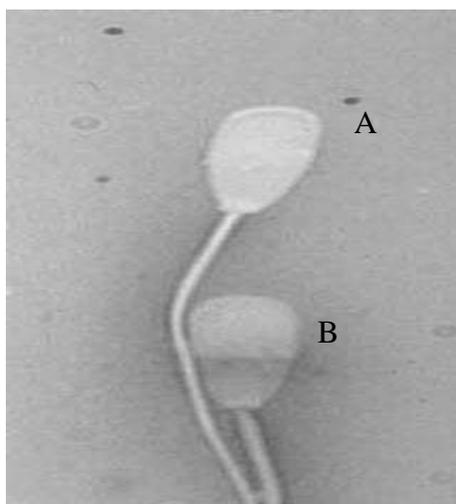
A: espermatozoide reaccionado a HOST. B: espermatozoide no reaccionado



A: Espermatozoide reaccionado a HOST. B: Espermatozoide no reaccionado

Test de Resistencia Osmótica (ORT)

El ORT se realizó tomando dos alícuotas de semen descongelado de 10 μ L cada una. Una de las muestras fue colocada en un medio hiposmótico (100mOsm/L), (citrato de sodio al 0.49 % y fructosa al 0,9) y la otra (control), en condiciones isosmóticas de 300 mOsm/L (citrato de sodio al 2,92 %). Luego se incubaron en un baño maría a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se tomó una gota de semen (10 μ L) y se evaluaron, en microscopio Leica DM 2000 con contraste de fase a 1000 aumentos, un total de 200 espermatozoides, observando el número de acrosomas alterados. Se sumaron los espermatozoides con pérdidas totales o parciales de acrosoma en el medio hiposmótico más los espermatozoides con pérdidas totales o parciales de acrosoma en medio isosmótico, se dividió por dos y se expresó el resultado en porcentaje (Rubio-Guillén y Quintero-Moreno, 2009).



A: Espermatozoide con acrosoma intacto, B: Espermatozoide con pérdida total de acrosoma (adaptado de Rubio, 2006)

Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF)

La inseminación artificial a tiempo fijo se realizó en tres lotes de vacas de raza Angus de 108, 84 y 50 vacas respectivamente, dividiendo cada lote en tres grupos, asignando al azar un grupo a cada toro y, a su vez, dividiéndolo en dos subgrupos, designados como control (descongelado las dosis seminales a 37 °C durante un minuto previo a la inseminación) y tratamiento (sometiendo a las dosis seminales a incubación a 22 °C durante 20 minutos previo la inseminación) respectivamente. Las vacas incorporadas al programa de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo fueron seleccionadas por funcionalidad por medio de la presencia de cuerpo lúteo o de folículos ováricos mayores a 8 mm de diámetro, mediante el uso de la ultrasonografía ovárica. Las mismas fueron sincronizadas mediante la aplicación de un dispositivo intravaginal con 500 mg de progesterona y 2 mg de benzoato de estradiol por vía intramuscular en el día de inicio de la sincronización, considerado como día “0”, retirando el dispositivo el séptimo día, y aplicando 1 mg de Cipionato de Estradiol y 500 µg Cloprostenol. La totalidad de las vacas sincronizadas se inseminaron 52 a 56 horas post retiro del dispositivo. Las vacas seleccionadas tenían una condición corporal 2,5 o superior (Frasinelli, 2004), y fueron inseminadas por el mismo inseminador.

DIA 0	DIA 7	DIA 9	DIA 29 +/-1
Aplicación de dispositivo con 0,5 mg de progesterona + 2 mg de BE	Retiro de dispositivo intravaginal + 1mg CE	IATF 52 a 56 hrs. post retiro de dispositivo a grupo control y grupo tratamiento	Diagnóstico de preñez por ultrasonografía



Técnica de armado de dispositivo intravaginal con progesterona



Técnica de aplicación de dispositivo intravaginal con progesterona



Equipo de inseminación artificial



Técnica de ensamble de la pajueta de semen en la pistola de inyección y la vaina de inseminación



Técnica de inseminación artificial a campo



Lote de vacas a ingresar a la manga de inseminación



Estado corporal de las vacas que ingresaron al programa de inseminación artificial a tiempo fijo

Diagnóstico de Preñez

La preñez fue evaluada por ultrasonografía transrectal a los 29 (+/- 1) días de la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, con un ecógrafo Chison 500 5 MHz con transductor lineal.



Equipo de ultrasonografía utilizado en el diagnóstico de preñez



Embrión bovino de 30 días de gestación tomados desde el momento de la IATF

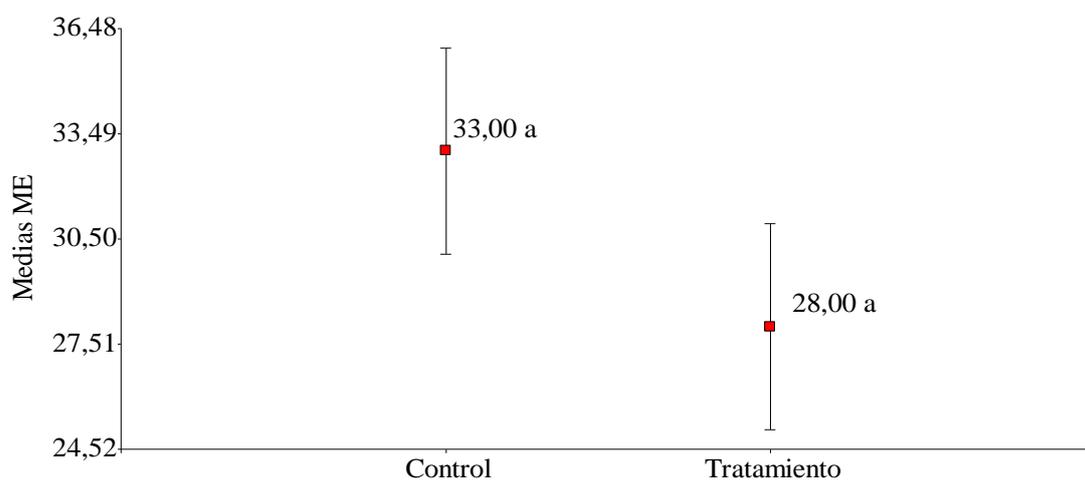
Método Estadístico

Se utilizó el Análisis de Varianza para evaluar la presencia de diferencias significativas entre protocolos de descongelado. Se compararon Motilidad Progresiva, Relación de espermatozoides Vivos y Muertos, Integridad Acrosómica, Test de Resistencia Osmótica (ORT) y Test de Endósmosis (HOST) con el porcentaje de vacas preñadas frente a los distintos protocolos de congelado. También se compararon las medias del porcentaje de preñez total por toro.

Por otro lado se utilizó el Test de Correlación para determinar asociación y Regresión Lineal para determinar relación entre variables.

RESULTADOS

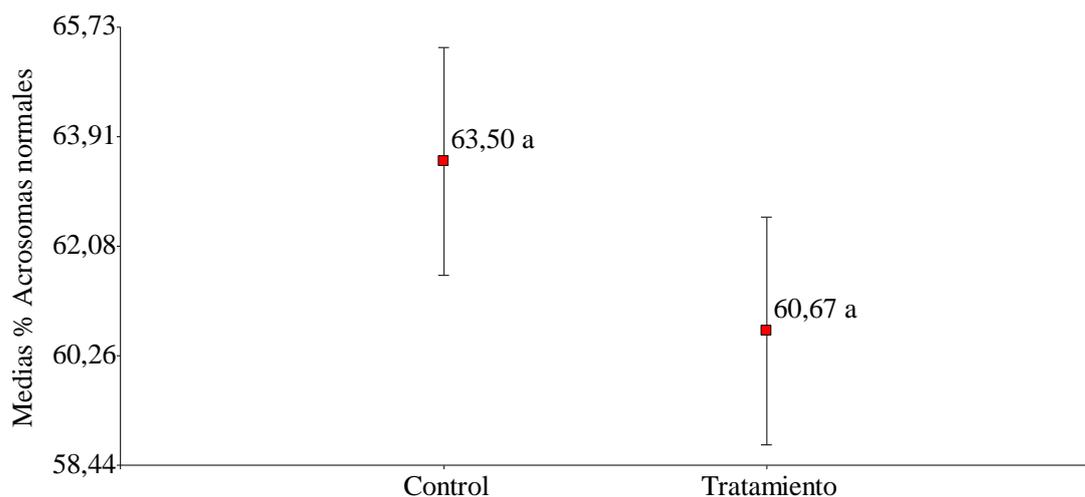
Gráfico 1. Medias y Errores Estándar para Motilidad Espermática entre control y tratamiento.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

No existieron diferencias significativas en la Motilidad Espermática entre el Control y el Tratamiento.

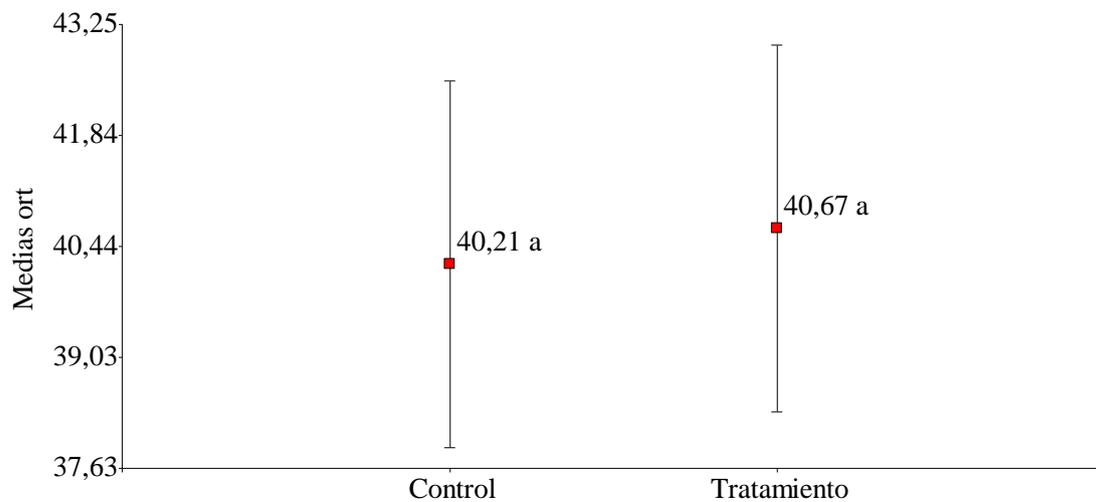
Gráfico 2. Medias y Errores Estándar para Integridad Acrosómica entre Control y Tratamiento.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

No existieron diferencias significativas en la integridad acrosómica entre el Control y el Tratamiento.

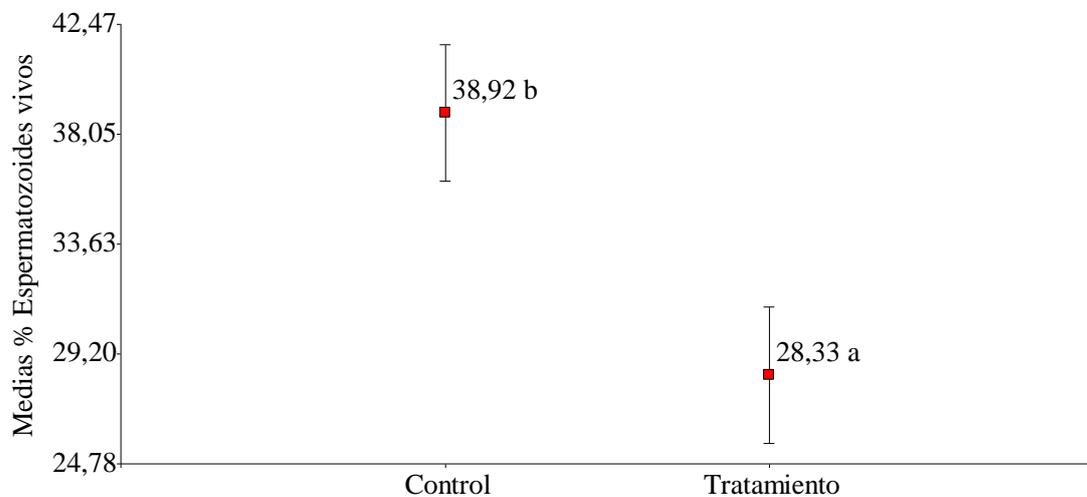
Gráfico 3. Medias y Errores Estándar para Test de Resistencia Osmótica entre Control y tratamiento



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

No existieron diferencias en el Test de Resistencia Osmótica entre el Control y el Tratamiento.

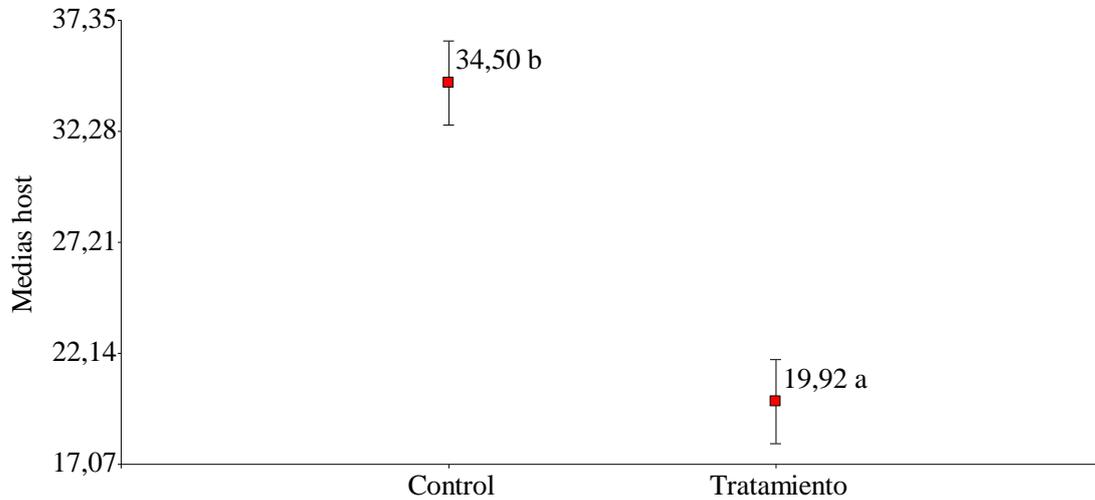
Gráfico 4. Medias y Errores Estándar para Vivos /Muertos entre control y tratamiento



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Existieron diferencias significativas para la relación de espermatozoides Vivos y Muertos entre el Control y el Tratamiento.

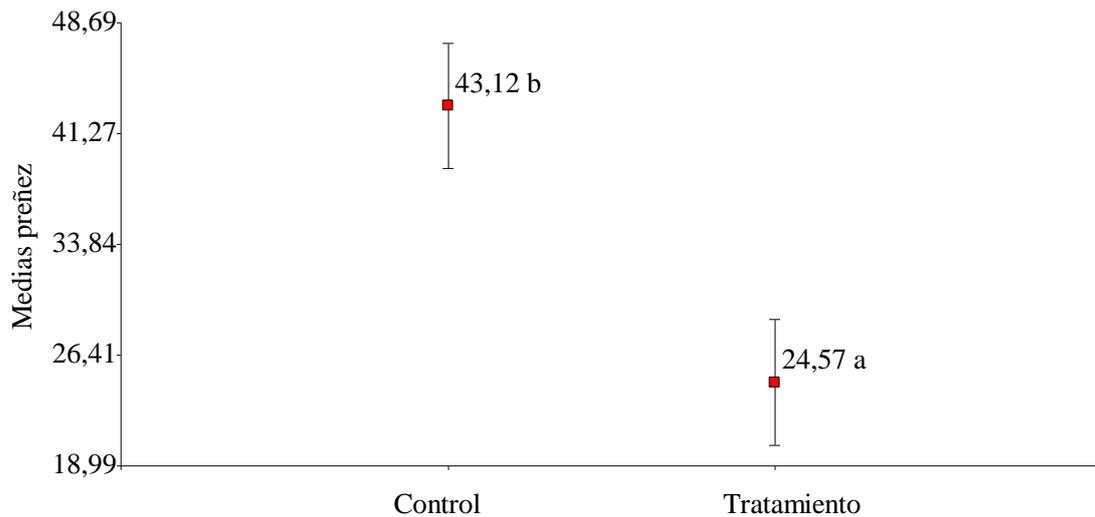
Gráfico 5. Medias y Errores Estándar para Test de Endosmosis entre control y tratamiento



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Existieron diferencias significativas para el Test Hipoosmótico entre el Control y Tratamiento.

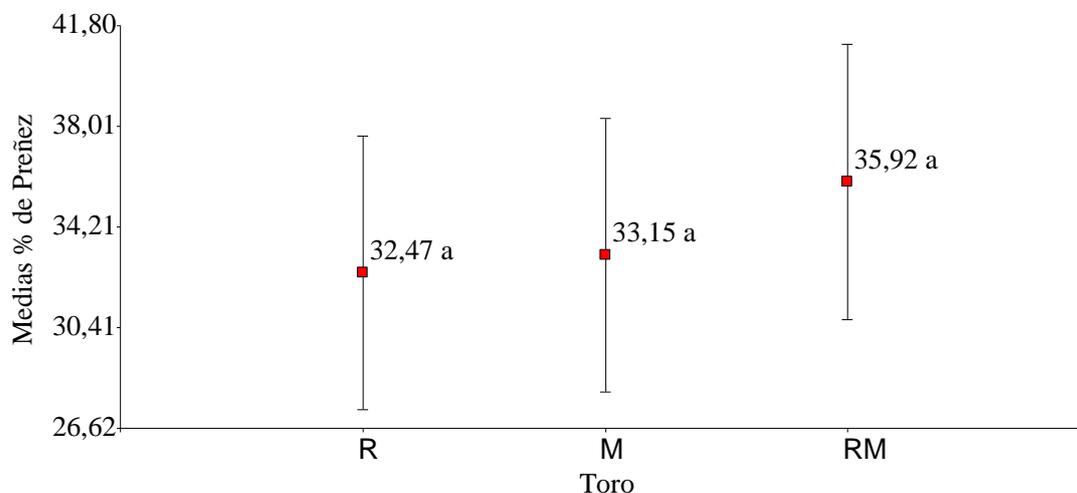
Gráfico 6. Medias y Errores Estándar para Porcentaje de Preñez en IATF entre control y tratamiento



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Existieron diferencias significativas en el porcentaje de preñez entre el Control y el Tratamiento.

Gráfico 7. Medias y Errores Estándar para Porcentaje de Preñez entre toros



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

No existieron diferencias significativas en el porcentaje de preñez entre toros.

Tabla 1: Correlación entre Motilidad Espermática, Integridad Acrosómica, Relación Vivos Muertos

	ME	AN	V/ M	HOS T	OR T
%Preñez	0,34	0,48	0,72	0,84*	0,03

Motilidad Espermática (ME); %de acrosomas normales (AN): % de espermatozoides vivos (V/M); % de espermatozoides positivos al Test de Endósmosis (HOST)*, % de espermatozoides positivos a Test de Resistencia Osmótica (ORT); $p < 0,05$.

Cuando se evaluó Test de Endósmosis frente al porcentaje de preñez, se encontró una correlación lineal alta entre ambos ($r = 0,84$ $p < 0,05$).

Tabla 2: Regresión Lineal para Porcentaje de Preñez en función del Test de Endósmosis

Variable	N	R ¹	R ²	AjECMP	AIC	BIC
PREÑEZ	6	0,71	0,63	90,15	42,81	42,19

El 63% de la variabilidad de la Preñez, puede ser explicada por la variable regresora % HOST. ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

La Inseminación Artificial solo puede aplicarse en forma masiva en los rodeos bovinos de las zonas marginales de nuestro país mediante la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo. Esta técnica, que se evalúa por el porcentaje de hembras preñadas, es el único medio eficiente para introducir genética superior, y genera en la vaca un *priming* de progesterona en su primer ciclo postparto (Callejas, 2016), lo que se traduce en una mejor calidad de los ovocitos, y además adelanta la aparición del primer celo post parto en un porcentaje importante de vacas (Colazo, 2014). Esto, desde el punto de vista productivo, se traduce en más vacas en la cabeza de parición y, por ende mayor peso de los terneros al destete (Menchaca, 2013).

Para la difusión de la inseminación artificial en bovinos, y especialmente la implementación de programas a tiempo fijo en regiones productivas alejadas, es inevitable el uso de semen congelado. El proceso de congelado-descongelado altera estructuras indispensables para la funcionalidad del espermatozoide, tanto para la penetración de la zona pelúcida, como para el reconocimiento de la membrana plasmática del ovocito. Un protocolo de congelado y descongelado exitoso debería proteger el acrosoma y la membrana plasmática para mantener la capacidad fecundante del espermatozoide (Hammerstedt, 1990; Khalil, 2017). En el presente trabajo se comparó la eficiencia de algunas pruebas morfológicas y fisiológicas con la fertilidad a campo del semen, evaluada a través del porcentaje de preñez en un programa de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo. La Motilidad Espermática, evaluada mediante microscopio de campo claro y bajo contraste de fase, no mostró diferencias entre los tratamientos testeados (Gráfico 1), ni tampoco permitió demostrar asociación con el porcentaje de preñez cuando se evaluó la asociación entre variables (tabla 1). Estos datos coinciden con lo observado por Vera (2003) y Denise (2018). Sin embargo la evaluación de la Motilidad por sistemas computarizados, proveería información valiosa relacionada a la fertilidad a campo del semen bovino (Kathiravan, 2008; Veloz, 2017; Denise, 2018). En cuanto a la evaluación de la integridad acrosómica (Gráfico 2), no se encontraron diferencias entre tratamientos, ni correlación con la fertilidad a campo (tabla 1), aunque diversos trabajos sugieren que toros con alta proporción de alteraciones acrosomales suelen tener una fertilidad baja (Peña y Linde-Forsberg, 2000).

Suleyman *et al.* (2008) demostraron que los defectos de acrosoma fueron significativamente menores en un grupo de toros de alta fertilidad comparados con los de baja fertilidad. También Tartaglione y Ritta (2004) demostraron que la integridad de la membrana acrosomal refleja la viabilidad espermática. El proceso de criopreservación podría afectar estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada, viéndose afectada la fertilidad, por lo que la evaluación de la integridad acrosómica sería un factor importante en la evaluación de la fertilidad del semen. Por otro lado solo la observación directa del acrosoma no cumple con lo postulado por Cross y Meizel (1989) en cuanto a que el método de evaluación debe ser exacto y rápido, y ser capaz de diferenciar reacciones acrosómicas falsas y lesiones verdaderas.

Los resultados obtenidos respecto la relación vivo/muertos, son coincidentes con lo observado por Bernardi (2011) para un protocolo de descongelado a 37°C y exposición de la muestra seminal a 22 C° durante 20 minutos, encontrando diferencias entre tratamientos (Gráfico 4) pero no se observó asociación con el porcentaje de preñez a campo (tabla 1)., con respecto a la correlación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las dosis seminales evaluadas por diferentes métodos, hay discrepancia entre distintos autores, Decuadro *et al.* (2002) y Christensen *et al.* (2004) encontraron relación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante, mientras que Graham (2001) observó que la viabilidad espermática apenas se correlacionaba con la fertilidad. No obstante, los métodos de evaluación utilizados en estos casos son complejos, imposibles de utilizar bajo las condiciones ambientales en las cuáles se desarrolló el presente trabajo, que buscó determinar la eficacia de pruebas simples para evaluar la efectividad presunta de un semen utilizado bajo condiciones de campo en zonas marginales. Recientes investigaciones han utilizado la viabilidad espermática para evaluar dosis descongeladas y relacionarla con la fertilidad, con resultados dispares, tanto como buenos predictores de la capacidad fecundante (Morado *et al.*, 2015) o no (Sharma *et al.*, 2016). Si bien la relación vivos/muertos fue utilizada durante mucho tiempo y también modificada para evitar interacciones con los componentes de diluyentes para la criopreservación como la utilizada por Swanson y Bearden (1951), el uso de las tinciones supravitales es cada día más limitado.

El test de resistencia osmótica (ORT) tampoco arrojó diferencias significativas cuando se compararon los dos tratamientos (Gráfico 3), ni cuando se analizó la correlación con el porcentaje de vacas preñadas (tabla 1); este dato no coincide con lo determinado por Aisen *et al.* (2002) en carneros, quienes encontraron correlaciones altas y positivas con la tasa de fertilidad *in vivo*, aunque en ese trabajo se contrastó semen refrigerado ovino frente a la fertilidad del semen en un programa de inseminación artificial estándar.

La comparación entre tratamientos mediante el Test de Endósmosis (HOST) mostró diferencias significativas (Gráfico 5), encontrándose asociación con el porcentaje de preñez (tabla 1). Se encontró una relación significativa entre ambas variables (tabla 2), demostrando la importancia en la incorporación de la misma en la batería de pruebas a utilizar en la predicción de capacidad fecundante del semen bovino congelado para programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo. Esta prueba es además objetiva desde el punto de vista de la evaluación, de bajo costo, realizable con equipamiento sencillo y de fácil aplicación, características valorables para las condiciones en las cuáles se desarrolla la actividad en vastas zonas ganaderas marginales de nuestro país, como en las que se implementó el presente trabajo. Diversos ensayos han evaluado al Test de Endósmosis como herramienta para predecir la capacidad fecundante del semen congelado en machos, encontrando resultados coincidentes con los obtenidos en este caso (Tamuli *et al.*, 1992, Correa *et al.*, 1997, Brito *et al.*, 2003), mientras que en algún caso no se encontró relación con la fertilidad *in vivo* (Sharma *et al.*, 2016). La diferencia con los trabajos anteriormente citados es que en los mismos no se evaluó la capacidad fecundante de semen de toro en un contexto de un protocolo de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo.

La evaluación de los porcentajes de preñez entre tratamientos mostró diferencias significativas (Gráfico 6), no encontrándose diferencias de preñez total entre el semen de los diferentes toros utilizados (Gráfico 7).

En la evaluación *in vivo* se observó que para el protocolo de manejo tradicional del semen con un descongelado a 37° C durante un minuto, previo a la Inseminación Artificial, los porcentajes fueron más bajos que los observados en diferentes trabajos relacionados al tema (Bó, 2002, 2005; Callejas, 2009; Vater, 2011). Se debe remarcar que la IATF en estas zonas marginales se aplica a vacas con terneros al pie en rodeos comerciales y se obtiene un porcentaje de preñez de alrededor del 40 % el primer día de servicio, en una temporada que dura entre 70 y 120 días. Este porcentaje es considerado

muy bueno ya que, como se indicó al inicio de la discusión, no solo se evalúa esta biotecnología desde el porcentaje de preñez sino también como medio para introducir genética de calidad superior para las características comerciales buscadas, la generación de un *priming* de progesterona (Colombo, 2007; Callejas, 2016) para adelantar la ciclicidad postparto en las vacas tratadas, que se traducirá en un impacto comercial importante, dado por un mayor porcentaje de terneros con mayor peso al destete.

CONCLUSIONES

Este trabajo demostró la utilidad del Test de Endósmosis, para evaluar la capacidad fecundante del semen bovino a través del porcentaje de preñez en un programa de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo, en condiciones reales, y en campos de zonas ganaderas marginales.

Como conclusión final, la incorporación del Test Hipoosmótico (HOST) a las pruebas de rutina en la evaluación de semen a campo sería una opción útil, de bajo costo, objetiva y de fácil aplicación en laboratorios en baja complejidad.

Por otro lado, se comprobó que la evaluación de la motilidad espermática, la relación vivos/muertos, la integridad acrosómica, y el test de resistencia osmótica, no tuvieron, bajo las condiciones de trabajo utilizadas, un valor predictivo determinante sobre la capacidad fecundante de las muestras de semen utilizadas en el programa de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo diseñado para este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aisen E, Medina V, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
2. Bernardi S, Allende R, Mazzeo R, Monti J, Marini P. 2011. Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet* 13:2.
3. Bó G, de la Mata J, Baruselli P, Menchaca A. 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86 (1):388-96.
4. Bó G, Baruselli P. 2014. Synchronization of ovulation and fixed time artificial inseminate on in beef cattle. *Animal*. Suppl 1:144-50.
5. Bó G, Chesta P, Cutaia L. 2008. Claves para una IATF exitosa en rodeos de cría. *Taurus*. 14-32.
6. Bó G, Cutaia L, Chesta P, Balla E, Pincinato D, Peres L, Maraña D, Avilés M, Menchaca G, Baruselli P. 2005. Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría de Argentina. En: VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal (IRAC). Huerta Grande, Córdoba (Argentina), pp. 97–128.
7. Bó G, Cutaia L, Tríbulo R. 2002. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. *Taurus* 4 (14): 1–14.
8. Brito L, Barth A, Bilodeau-Goeseels S, Panich P, Kastelic JP. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60 (8): 1539-1551.
9. Buranaamnuaya K, Seesuwana Saikhunaa K. 2016. Preliminary study on effects of bovine frozen semen storage using a liquid nitrogen-independent method on the quality of post-thaw spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 172: 32–38.
10. Callejas S, González Chaves S, Uslenghi G, Massara N, Cledou G, Cabodevila J. 2009. Efecto de la utilización de dispositivos intravaginales con diferentes cantidades de progesterona sobre el porcentaje de preñez a la IATF en vacas con cría. En: VIII

Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal (IRAC). Huerta Grande, Córdoba (Argentina) 10.

11. Callejas S, González Chaves S, Catalano R, Cabodevila J. 2016. Efecto de la cantidad de progesterona y de la eCG sobre el porcentaje de preñez a la IATF en vacas con cría. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 36 (Supl. 1): 7.

12. Christensen P, Stenvang J, Godfrey W. 2004. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian semen. *J. Androl.* 25 (2): 255-64.

13. Colazo M, Mapletoft R. 2014. Fisiología del Ciclo Estral Bovino. *Revista Ciencias Veterinarias*, 16 (2). 31-46.

14. Colombo M, Villafañe P, Cledou G, Bartolomé J. 2007. Administración de un dispositivo intravaginal de progesterona en vacas en anestro durante el servicio natural para adelantar la concepción. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal - IRAC pp 299.

15. Correa J, Zavos J. 1994. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42 (2):351-360.

16. Cross N, Meizel S. 1989. Mini review-methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 41: 635-641.

17. Denise S, Okano L, Jurandy M, Penitente-Filho L, Victor E, Gomez León L, Paula P, Maitan L, Camila O, Silveira L, Bruna Waddington L, Edgar A, Díaz-Miranda L, da Costa R, Simone E, Guimarães J, Guimarães L. 2018. In vitro evaluation of cryopreserved bovine sperm and its relation to field fertility in fixed-time artificial insemination. *Reproduction In Domestic Animals*. DOI: 10.1111/rda.13401. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/rda.13401>

18. Didion B, Dowrinsky J, Giles J, Graves C. 1990. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 22: 51-57.

19. Edwards S, Bo G, Chandra K, Atkinson P, Mc Gowan M. 2015. Comparison of the pregnancy rates and costs per calf born after fixed-time artificial insemination or artificial insemination after estrus detection in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 83(1):114-20.

20. Frasinelli C, Casagrande H, Veneciano J. 2004. La Condición Corporal como Herramienta de Manejo en Rodeos de Cría. Información Técnica Inta n° 168. ISSN 0327-425 X.
21. Graham JK, 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 68: 239-247.
22. Hammerstedt R, Graham J, Nolan J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.
23. Jeyendran R, Van der H, Pérez-Peláez M, Crabo B, Zaneveld L. 1984. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219-228.
24. Kathiravan P, Kalatharan J, John Edwin M, Veerapandian C. 2008. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*; 104:9-17.
25. Khalil W, El-Harairy M, Zeidan A, Hassan M, Mohey-Elsaeed O.2017. Evaluación de espermatozoides de toro durante y después de la crioconservación: perspectivas estructurales y ultraestructurales. *Int J Vet Sci Med.* S49-S56.
26. Laureiro G. 1999. Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Obstetrics and Gynaecology. Uppsala. 9-28.
27. Madrid-Bury N. 2004. Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonos. Universidad Complutense de Madrid, España. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral. 1-164 pp.
28. Menchaca A, Núñez R, Castro T, García Pintos C, Cuadro F. 2013. Implementación de Programas de IATF en Rodeos de Cría <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7579/1/st-208-.p.229-246>.
29. Morado S, Pereyra V, Breininger E, Sara R, Cetica P. 2015 .Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry* 2(1): 1005-1008.
30. Parks J, Graham J. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
31. Peña A, Linde-Forsberg C. 2000. Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.

32. Pickett B, Berndtson W, Lodge J. 1978. Principles and Techniques of Freezing Spermatozoa. *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. WH Freeman and Company, San Francisco, CA, pp. 494–589.
33. Rota A, Penzo N, Vicenti L, Mantovani R. 2000. Hypoosmotic Swelling (HOST) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenol.* 53: 1415-1420.
34. Rubio-Guillén J, Quintero-Moreno A, 2009. Effect of cryopreservation on integrity of plasmatic and acrosomal membrane of bulls sperm. Unidad de Investigación en Producción Animal (UNIPA), Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia (LUZ). FCV-LUZ. Apdo. 15252.
35. Rubio J. 2006. Efecto de la criopreservación sobre la calidad seminal y la fertilidad de toros holstein, brahman y sus mestizos. Universidad de Zulia (LUZ). Facultad de Agronomía. Tesis de Maestría. 1-103 pp.
36. Sharma M, Singh M, Sharma A, Kumar P. 2016. Correlation between semen evaluation parameters and fertility of frozen-thawed semen of jersey local hill cattle crossbred bulls. *Indian Journal of Animal Reproduction* 37(1): 52-54.
37. Swanson E, Bearden H. 1951. An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 10:4, 981–987.
38. Suleyman B, Muzaffer T, ü müt C, Özen, Kemal K. 2008. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Anim. Reprod. Sci.* 104:38-46.
39. Tamuli MK, Watson PF. 1992. Effects of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress in boar spermatozoa incubated for up 24 hours. In: Proc XIII ICAR Congress. The Hague. 1484-1486
40. Tartaglione C, Ritta M. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62: 1245–1252.
41. Vater A, Rodríguez Aguilar S, Loza J, Otero Illia M, Cabodevila J, Callejas S. 2011. Efecto del manejo de vacas con cría durante la implementación de una IATF sobre la tasa de preñez. *Taurus*, 13 (51):17-20.
42. Veloz D. 2017. Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cuenca Ecuador. 2017. CI. 1720299302 CI. AAA 558960 C.

43. Vera O. 2003 Evaluación Seminal Comparativa Pre y Postcongelación en Machos Bovinos. Capítulo XII. In: C. González-Stagnaro (Ed) Reproducción Bovina. Ediciones Astro data SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. 1–11.
44. Watson P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7: 871–891.
45. Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 481-492.

APÉNDICE

Tabla 3. Resultados de Laboratorio

TORO	ME ctrl	ME trat	AN ctrol	AN trat	VM ctrol	VM trat	HOST ctrol	HOST trat	ORTctrol	ORT trat
R1	30	20	59	56,5	31	22	30	16	29,5	51,25
R2	33	27	62	60	35,5	19	36,5	21,5	45,5	42,25
M1	45	35	60	56,5	46	36,5	41	27,5	40,5	36,5
M2			61	59,5	41	36,5	39,5	16,5	44,5	40,25
RM1	30	25	71	68	36,5	26	31	19	40	36,25
RM2	27	23	68	63,5	33,5	26	29	19	41,25	37,5

ME control: % de espermatozoides con motilidad progresiva para el grupo control

ME tratamiento: % de espermatozoides con motilidad progresiva para el grupo tratamiento

AN control: % de espermatozoides con acrosomas normales para el grupo control

AN tratamiento: % de espermatozoides con acrosomas normales para el grupo tratamiento

VM ctrol: % de espermatozoides vivos para el grupo control

VM trat: % de espermatozoides vivos para el grupo tratamiento

HOST ctrol: % de espermatozoides reaccionados a Test de Endósmosis para el grupo control

HOST trat: % de espermatozoides reaccionados a Test de Endósmosis para el grupo tratamiento

ORT ctrol: % de espermatozoides con acrosoma normal para el grupo control

ORTtrat: % de espermatozoides con acrosoma normal para el grupo tratamiento

Tabla 4. Resultados de preñez

RODEO	VACA	TORO	PROTOCOLO	PREÑEZ
1	7302	M	37	preñada
1	7363	M	37	vacía
1	7375	RM	22	vacía
1	7381	R	37	preñada
1	7383	M	37	preñada
1	7388	R	37	vacía
1	7389	RM	22	preñada
1	7391	RM	37	preñada
1	7396	M	22	vacía
1	7405	M	22	preñada
1	7406	RM	22	preñada
1	7418	M	37	preñada

1	7419	R	37	preñada
1	7425	M	22	preñada
1	7428	RM	37	vacía
1	7437	RM	37	preñada
1	7441	RM	37	preñada
1	7444	M	22	vacía
1	7445	M	22	vacía
1	7447	RM	37	vacía
1	7481	RM	22	vacía
1	7485	R	22	vacía
1	7486	R	37	vacía
1	7493	M	22	preñada
1	7494	RM	22	vacía
1	7497	R	37	preñada
1	7499	M	22	vacía
1	9528	R	22	preñada
1	9529	R	37	preñada
1	9566	M	37	vacía
1	A232	M	22	preñada
1	A233	R	37	vacía
1	A242	M	22	vacía
1	A446	R	22	preñada
1	A465	M	22	vacía
1	A487	M	22	vacía
1	A490	R	22	vacía
1	A496	RM	22	vacía
1	A558	R	22	preñada
1	A562	M	37	preñada
1	A570	M	37	preñada
1	A627	RM	37	preñada
1	A667	R	37	preñada
1	A668	R	37	vacía
1	A669	RM	22	preñada
1	A670	RM	37	vacía
1	A672	M	37	vacía
1	A673	R	37	preñada
1	A675	R	37	vacía
1	A677	R	22	vacía
1	A678	M	37	vacía
1	A679	RM	22	vacía
1	A681	M	22	vacía
1	A683	R	37	vacía
1	A684	RM	22	vacía
1	A686	RM	37	preñada
1	A768	RM	37	vacía

1	A790	R	22	vacía
1	A793	R	22	vacía
1	A799	M	37	preñada
1	A800	M	37	vacía
1	A802	RM	22	vacía
1	A812	RM	37	vacía
1	A835	RM	22	vacía
1	A836	R	37	vacía
1	A837	RM	37	vacía
1	A838	M	22	vacía
1	A841	M	22	vacía
1	A846	RM	22	vacía
1	A847	RM	22	vacía
1	A848	M	37	vacía
1	A849	R	37	vacía
1	B002	RM	37	vacía
1	B003	R	22	vacía
1	B004	RM	37	vacía
1	B005	R	22	vacía
1	B006	M	37	vacía
1	B007	R	22	vacía
1	B011	R	22	vacía
1	B012	RM	22	vacía
1	B013	R	22	vacía
1	B015	RM	37	vacía
1	B016	R	22	vacía
1	B017	M	37	vacía
2	7302	M	37	preñada
2	7350	R	37	preñada
2	7353	R	22	preñada
2	7381	M	22	vacía
2	7383	R	37	vacía
2	7388	RM	37	preñada
2	7389	M	37	preñada
2	7405	M	37	vacía
2	7420	R	22	preñada
2	7425	RM	22	vacía
2	7426	R	37	vacía
2	7429	RM	37	preñada
2	7437	M	37	preñada
2	7438	M	22	vacía
2	7444	R	37	preñada
2	7447	RM	37	vacía
2	9521	M	37	vacía
2	9528	RM	22	vacía

2	9529	RM	22	vacía
2	A233	M	22	vacía
2	A242	M	22	vacía
2	A453	M	22	preñada
2	A462	R	22	vacía
2	A465	R	37	preñada
2	A476	RM	37	preñada
2	A487	RM	37	preñada
2	A562	R	22	vacía
2	A570	M	37	preñada
2	A669	R	37	vacía
2	A675	RM	22	vacía
2	A676			
2	A677	RM	22	vacía
2	A679	R	37	vacía
2	A681	R	22	vacía
2	A755	M	22	vacía
2	A768	M	37	vacía
2	A790	RM	22	preñada
2	A799	RM	37	preñada
2	A800	R	22	vacía
2	A802	RM	22	preñada
2	A812	M	37	preñada
2	A836	R	22	preñada
2	A840	RM	37	preñada
2	A846	R	37	vacía
2	A847			
2	A848	RM	22	vacía
2	B002	RM	22	vacía
2	B004	R	37	preñada
2	B005	M	22	vacía
2	B006	R	37	preñada
2	B007	M	22	vacía
2	B009	R	37	vacía
2	B011	RM	37	preñada
2	B015	M	22	preñada
2	B019	M	22	vacía
3	5972	RM	22	vacía
3	5975	M	37	vacía
3	7300	R	22	vacía
3	7303	M	22	preñada
3	7305	RM	37	preñada
3	7306	R	37	preñada
3	7307	RM	22	preñada
3	7309	RM	37	vacía

3	7310	R	22	preñada
3	7312	M	37	preñada
3	7313	RM	22	vacía
3	7314	M	22	vacía
3	7338	M	22	preñada
3	7345	RM	22	vacía
3	7346	R	37	vacía
3	7348	M	37	preñada
3	7349	R	37	vacía
3	7351	RM	37	preñada
3	7354	R	37	vacía
3	7356	R	22	preñada
3	7363	RM	37	vacía
3	7369	M	37	vacía
3	7371	RM	37	vacía
3	7372	RM	22	preñada
3	7378	RM	22	preñada
3	7380	R	37	vacía
3	7385	M	37	vacía
3	7387	R	37	vacía
3	7391	RM	37	preñada
3	7392	M	22	vacía
3	7395	M	22	vacía
3	7404	RM	22	vacía
3	7413	RM	22	vacía
3	7414	M	37	preñada
3	7415	R	22	vacía
3	7448	M	37	vacía
3	A140	R	37	preñada
3	A141	RM	37	preñada
3	A161	R	22	vacía
3	A218	RM	37	vacía
3	A236	RM	22	vacía
3	A246	M	22	vacía
3	A296	M	37	vacía
3	A315	M	37	vacía
3	A325	R	37	preñada
3	A337	R	37	vacía
3	A350	RM	22	vacía
3	A351	M	22	vacía
3	A445	R	22	vacía
3	A453	RM	22	preñada
3	A459	R	37	vacía
3	A461	R	37	vacía
3	A464	RM	22	vacía

3	A466	RM	37	preñada
3	A470	RM	22	vacía
3	A471	R	37	vacía
3	A475	M	37	vacía
3	A476	3	37	vacía
3	A477	M	37	preñada
3	A478	R	22	preñada
3	A481	R	22	vacía
3	A482	RM	37	preñada
3	A483	M	22	vacía
3	A484	R	37	preñada
3	A488	R	22	vacía
3	A489	RM	22	vacía
3	A490	M	37	vacía
3	A491	R	37	vacía
3	A493	M	22	vacía
3	A495	RM	37	vacía
3	A497	RM	22	vacía
3	A498	R	37	vacía
3	A499	M	37	vacía
3	A500	RM	22	vacía
3	A502	R	22	preñada
3	A507	M	37	vacía
3	A508	M	22	vacía
3	A509	RM	37	vacía
3	A510	R	37	preñada
3	A512	R	22	vacía
3	A514	M	37	preñada
3	A515	RM	37	vacía
3	A516	R	37	preñada
3	A517	M	22	vacía
3	A520	RM	37	vacía
3	A521	R	22	vacía
3	A639	R	22	vacía
3	A718	M	37	vacía
3	A745	RM	37	vacía
3	A797	M	37	vacía
3	A822	M	37	preñada
3	A826	RM	22	preñada
3	A828	M	22	vacía
3	A830	RM	37	vacía
3	A831	M	22	vacía
3	A833	M	22	vacía
3	A834	RM	37	vacía
3	A835	RM	22	vacía

3	A837	R	22	vacía
3	A840	R	22	vacía
3	A842	RM	37	preñada
3	A843	R	22	vacía
3	A848	M	22	preñada
3	A849	M	22	vacía
3	A898	R	22	vacía
3	A899	M	22	vacía
3	A919	R	22	vacía
3	A924	M	22	preñada

Análisis de la varianza para MIP entre protocolos A y B

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
MIP	10	0,15	0,05	21,56	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	62,50	1	62,50	1,45	0,2637
CLASIF X PROTOCOLO	62,50	1	62,50	1,45	0,2637
Error	346,00	8	43,25		
Total	408,50	9			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,59142

Error: 43,2500 gl: 8

CLASIF X PROTOCOLO Medias n E.E.

B 28,00 5 2,94 A

A 33,00 5 2,94 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza para MIP entre toros para ambos protocolos de descongelado

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
MIP	10	0,64	0,35	17,87	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	260,00	4	65,00	2,19	0,2065
Toro	260,00	4	65,00	2,19	0,2065
Error	148,50	5	29,70		
Total	408,50	9			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=21,86178

Error: 29,7000 gl: 5

Toro Medias n E.E.

M2 sd 0 sd A

R1	25,00	2	3,85	B
RM1	27,50	2	3,85	B
RM2	30,00	2	3,85	B
R2	30,00	2	3,85	B
M1	40,00	2	3,85	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza para INTEGRIDAD ACROSOMICA entre protocolo A y protocolo B

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
ACRO	12	0,10	0,01	7,48	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	24,08	1	24,08	1,12	0,3157
CLASIF X PROTOCOLO	24,08	1	24,08	1,12	0,3157
Error	215,83	10	21,58		
Total	239,92	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,97642

Error: 21,5833 gl: 10

CLASIF X PROTOCOLO	Medias	n	E.E.
B	60,67	6	1,90 A
A	63,50	6	1,90 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza para INTEGRIDAD ACROSÓMICA entre toros para ambos protocolos de descongelado

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
ACRO	12	0,89	0,79	3,42	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	212,92	5	42,58	9,46	0,0082
Toro	212,92	5	42,58	9,46	0,0082
Error	27,00	6	4,50		
Total	239,92	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,44253

Error: 4,5000 gl: 6

Toro	Medias	n	E.E.
R1	57,75	2	1,50 A
M1	58,25	2	1,50 A
M2	60,25	2	1,50 A
R2	61,00	2	1,50 A
RM2	65,75	2	1,50 A B
RM1	69,50	2	1,50 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza para RELACIÓN VIVOS MUERTOS entre protocolos de descongelado A y B

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
VIVOS	12	0,43		0,37	20,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	336,02	1	336,02	7,43	0,0214
CLASIF X PROTOCOLO	336,02	1	336,02	7,43	0,0214
Error	452,54	10	45,25		
Total	788,56	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,65388

Error: 45,2542 gl: 10

CLASIF X PROTOCOLO	Medias	n	E.E.	
B	28,33	6	2,75	A
A	38,92	6	2,75	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza para RELACIÓN VIVOS MUERTOS entre toros para ambos protocolos de descongelado

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
VIVOS	12	0,44		0,00	25,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	346,44	5	69,29	0,94	0,5168
Toro	346,44	5	69,29	0,94	0,5168
Error	442,13	6	73,69		
Total	788,56	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=34,16357

Error: 73,6875 gl: 6

Toro	Medias	n	E.E.	
R2	27,25	2	6,07	A
R1	28,50	2	6,07	A
RM2	29,75	2	6,07	A
RM1	36,25	2	6,07	A
M2	38,75	2	6,07	A
M1	41,25	2	6,07	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza para HOST entre protocolos de descongelado A y B

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
HOST	12	0,74		0,72	17,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	638,02	1	638,02	28,65	0,0003
CLASIF X PROTOCOLO	638,02	1	638,02	28,65	0,0003
Error	222,71	10	22,27		
Total	860,73	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,07085*Error: 22,2708 gl: 10*

CLASIF X PROTOCOLO	Medias	n	E.E.	
B	19,92	6	1,93	A
A	34,50	6	1,93	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)***Análisis de la varianza para HOST entre toros para ambos protocolos de descongelado**

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
HOST	12	0,20	0,00	39,36	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	172,60	5	34,52	0,30	0,8956
Toro	172,60	5	34,52	0,30	0,8956
Error	688,13	6	114,69		
Total	860,73	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=42,62107*Error: 114,6875 gl: 6*

Toro	Medias	n	E.E.	
R1	23,00	2	7,57	A
RM2	24,00	2	7,57	A
RM1	25,00	2	7,57	A
M2	28,00	2	7,57	A
R2	29,00	2	7,57	A
M1	34,25	2	7,57	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)***Análisis de la varianza para ORT entre protocolos de descongelado A y B**

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
ORT	12	1,9	E-03	0,00	14,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,63	1	0,63	0,02	0,8918
CLASIF X PROTOCOLO	0,63	1	0,63	0,02	0,8918
Error	323,89	10	32,39		

Total 324,52 11

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,32112

Error: 32,3885 gl: 10

CLASIF X PROTOCOLO	Medias	n	E.E.
A	40,21	6	2,32 A
B	40,67	6	2,32 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza para ORT entre toros para ambos protocolos de descongelado

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ORT	12	0,16	0,00	16,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	51,61	5	10,32	0,23	0,9375
Toro	51,61	5	10,32	0,23	0,9375
Error	272,91	6	45,48		
Total	324,52	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=26,84092

Error: 45,4844 gl: 6

Toro	Medias	n	E.E.
RM1	38,13	2	4,77 A
M1	38,50	2	4,77 A
RM2	39,38	2	4,77 A
R1	40,38	2	4,77 A
M2	42,38	2	4,77 A
R2	43,88	2	4,77 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Análisis de la varianza para PREÑEZ entre protocolo de descongelado A y protocolo B

Variable	PROTOCOLO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
VACAS PREÑADAS	22	122	24,59	43,24	0,00	6,26	0,0023
VACAS PREÑADAS	37	123	43,09	49,72	0,00		

Análisis de la varianza de PREÑEZ entre rodeos

Variable	RODEO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
VACAS PREÑADAS	1	84	32,14	46,98	0,00	2,72	0,1324
VACAS PREÑADAS	2	53	45,28	50,25	0,00		
VACAS PREÑADAS	3	108	29,63	45,88	0,00		

Análisis de la varianza para PREÑEZ comparada entre toros

Variable	TORO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
VACAS PREÑADAS RM		81	35,80	48,24	0,00	0,13	0,9051
VACAS PREÑADAS M		82	32,93	47,28	0,00		
VACAS PREÑADAS R		82	32,93	47,28	0,00		

Análisis de la varianza para PREÑEZ entre los 3 toros evaluados para cada protocolo

PROTOCOLO	Variable	TORO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
22	VACAS PREÑADAS RM	41	24,39	43,48	0,00	0,02	0,9814	
22	VACAS PREÑADAS M	42	23,81	43,11	0,00			
22	VACAS PREÑADAS R	39	25,64	44,24	0,00			

PROTOCOLO	Variable	TORO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
37	VACAS PREÑADAS RM	40	47,50	50,57	0,00	0,40	0,7633	
37	VACAS PREÑADAS M	40	42,50	50,06	0,00			
37	VACAS PREÑADAS R	43	39,53	49,47	0,00			

Coefficientes de correlación

Correlación de Pearson: Coeficientes/probabilidades

	MIP	ACRO	VIVOS	HOST	ORT	PREÑEZ
MIP	1,00	0,68	0,07	0,09	0,77	0,52
ACRO	-0,22	1,00	0,72	0,89	0,56	0,33
VIVOS	0,78	0,19	1,00	0,05	0,74	0,11
HOST	0,74	0,07	0,81	1,00	0,97	0,04
ORT	-0,16	-0,30	-0,17	-0,02	1,00	0,95
PREÑEZ	0,34	0,48	0,72	0,84	0,03	1,00

	ME	AN	V/M	HOST	ORT
%Preñez	0,34	0,48	0,72	0,84*	0,03

Motilidad Espermática (ME); integridad acrosómica (AN); % de espermatozoides vivos; (% Vivos); % de espermatozoides positivos al Test de Endósmosis (% HOST); porcentaje de espermatozoides normales a test de endósmosis. ($p < 0,05$)

Cuando se evaluó Test de endosmosis con porcentaje de preñez, se encontró correlación lineal entre ambos ($r= 0,84$ $p < 0,05$).

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ²	Aj	ECMP	AIC	BIC
PREÑEZ	6	0,71	0,63	90,15		42,81	42,19