

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

USE OF CHILLED AND FROZEN SEMEN IN A FIXED-TIME ARTIFICIAL INSEMINATION PROTOCOL IN WAGYU HEIFERS

Lino Mercado León¹

Resumen

La presente investigación tiene como objetivo determinar el efecto de la criopreservación del semen sobre la eficiencia reproductiva en un rodeo de vaquillonas de carne. Se usaron 97 vaquillonas y vacas de raza cruce Wagyu. A la primera fracción (Semen congelado SC) se la diluyó 1:8 ajustando la dosis inseminante a 25×10^6 spz en pajuelas de 0.5 ml. Para la congelación se utilizó el método estándar de congelación, congelándose en vapores de nitrógeno líquido. Se realizó el examen ginecológico a las vaquillonas seleccionadas: Además, la Inseminación Artificial se realizó a tiempo fijo a las 52 horas de retirados los implantes. Los resultados muestran la existencia de una significancia de ($P < 0,05$) existiendo una asociación entre el semen congelado/descongelado y refrigerado y es estadísticamente significativa. También, muestra se obtuvo una significancia de ($P < 0,05$) entre el semen congelado/descongelado y refrigerado sobre la integridad de membrana del espermatozoide y es estadísticamente significativa. Las conclusiones demuestran que los espermatozoides de cada una de las vaquillonas evaluados resistieron la criopreservación de forma diferente, por tanto, la integridad estructural y funcional de las vaquillonas puede verse afectada negativamente por el daño criogénico, lo que podría afectar la capacidad de fertilizar de las muestras seminales destinadas a la inteligencia artificial (IA).

Palabras clave: Criopreservación, Semen Congelado, Vaquillonas, Inteligencia Artificial

Abstract

The objective of this research was to determine the effect of semen cryopreservation on reproductive efficiency in a beef heifer herd. Ninety-seven Wagyu crossbred heifers and cows were used. The first fraction (SC frozen semen) was diluted 1:8 by adjusting the inseminant dose to 25×10^6 spz in 0.5 ml straws. For freezing, the standard freezing method was used, freezing in liquid nitrogen vapors. A gynecological examination was performed on the selected heifers: In addition, Artificial Insemination was performed at a fixed time 52 hours after the implants were removed. The results show the existence of a significance of ($P < 0.05$) with an association between frozen/thawed and refrigerated semen and it is statistically significant. Also, a significance of ($P < 0.05$) was obtained between frozen/thawed and refrigerated semen on sperm membrane integrity and is statistically significant. The findings demonstrate that spermatozoa from each of the heifers evaluated resisted cryopreservation differently, therefore the structural and functional integrity of heifers may be negatively affected by cryogenic damage, which could affect the fertilizing ability of semen samples intended for artificial intelligence (AI).

Recibido: 10 de septiembre de 2023 / Evaluación: 12 de octubre de 2023 / Aprobado: 02 de noviembre de 2023

¹ Administrador de Empresas, Universidad de Pamplona, Colombia. Magíster en Dirección de Marketing, Universidad Viña del Mar, Chile. Docente Investigador, Consultor en Marketing. Email: linomercado@gmail.com

Key words: Cryopreservation, Frozen Sperm, Heifers, Artificial Intelligence

Introducción

La tecnología se está desarrollando más rápidamente ahora que cuando se creó la Inseminación artificial (IA) aproximadamente 75 años, pero aún no ha alcanzado su máximo potencial porque muchos factores diferentes deben trabajar juntos para que tenga éxito. Ejemplo de ello es la transmisión de embriones como componente estándar de las prácticas de cría de ganado y se utiliza de forma amplia en todo el mundo. A pesar de esto, sólo entre el 1% y el 2% de las poblaciones reproductoras de élite la utilizan inseminación artificial a pesar de que se admite que este procedimiento genético viable en los bovinos hembras (Niemann y Seamark, 2018).

Estos novedosos procesos ofrecen una variedad de opciones para optimizar la efectividad reproductiva de los bovinos hembras durante la inseminación artificial, pero su efectividad depende de la clasificación y valoración precisa de todo el procedimiento, buscando sustitutos que admitan evaluar la conducta del rebaño. De manera que, las medidas auténticas habituales de reproducción como días abiertos, servicios por concepción e intervalos entre partos, son de poca utilidad hoy dado que no fueron desarrolladas para tomar en cuenta el comportamiento del rebaño. Además, la oportunidad de hacer coincidir la creciente demanda mundial de alimentos con la demanda de una producción de rumiantes respetuosa con el medio ambiente existe con los sistemas de producción de alimentos basados en pastos (Horan y Roche, 2019).

La administración de hormonas a las vacas es un medio rápido para la deducción de la fertilidad, ya que se han creado diversas terapias hormonales que pueden regular el período de la inicial inseminación artificial (IA), las posteriores y el procedimiento de las vacas en anestro (Cuatia, 2011). Por ello, el uso de la inseminación artificial ha permitido la obtención de óptimos resultados porque reduce el número de días expuestos en las vacas mediante diversos protocolos, por lo que esto ha llevado a la ejecución de programas de inseminación que tienen una serie de beneficios (Morrow et al., 2009).

Actualmente se encuentran disponibles y son eficaces dispositivos liberadores de progesterona que se mantienen en la vagina durante siete u ocho días. En lo que se conoce como día 0 de tratamiento, se administra una inyección intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol junto con la inserción del dispositivo intravaginal liberador de progesterona. El dispositivo se retira los días siete u ocho y se aplican (IM) 0,5 mg de cipionato de estradiol (ECP) o una dosis de prostaglandina luteolítica (PGF2a) y 1 mg de benzoato de estradiol (BE) (IM) 24 horas después (Bó y Baruselli, 2002).

De igual forma, los tratamientos cortos son una nueva generación de formalidades que han surgido en los últimos diez años, demostrándose estos aumentan la tasa de embarazo porque acortan el tiempo necesario para insertar dispositivos que contienen progesterona, acortan el tiempo necesario para la dominancia del folículo y prolongan el proestro antes de la ovulación (Bridges et al., 2008).

Se podría argumentar que el semen fresco tiene claras ventajas sobre el congelado porque desperdicia menos semen congelado y permite que los toros de élite tengan más descendencia a lo largo de sus vidas, dependiendo de su calidad, congelar el semen rinde entre 700 y 900 pajitas por eyaculación; el semen fresco produce entre 5.000 y 6.000 pajitas. Por tanto, gracias la utilidad de las hembras, se puede cubrir la gran demanda

estacional con sólo 30 o 40 de los mejores toros, frente a los 100 que se necesitan con los congelados (RumiNews (2020)).

Es importante señalar que el semen se conserva a temperatura ambiente para impedir fluctuaciones de temperatura, exhibición a la luz, contacto con agua o cualquier tipo de vapores químicos, el procedimiento debe ser rápido. Además, el semen se recolecta, analiza y procesa en el mismo lugar y día, y luego procesado y enviado a las granjas al día siguiente RumiNews (2020).

Desde este discernimiento, diversos autores como González et al., (2016), evaluaron el porcentaje de preñez realizando inseminación artificial tras-vaginal con semen congelado y con semen congelado diluido y con el TCM 199 como parte del diluyente, logrando valorar la posibilidad del semen y su actividad para la preñez de las ovejas, tomando en consideración dos grupos cada uno de 30 ovejas, que fueron inseminadas aleatoriamente, 15 con semen congelado y las otras 15 con semen congelado diluido y con el TCM 199 como parte del diluyente, se llevó a cabo una ecografía tras-vaginal a los 54 días después de la inseminación. Como resultado, se tiene que el 27 por ciento de las ovejas que llevaban el diluyente quedaron preñadas, en paralelo con el 13 por ciento que fueron inseminadas sin él, lográndose descubrir la existencia de factores climáticos desfavorables que podían tener alguna afectación en los resultados de la investigación, aunque el diluyente no produjo los resultados esperados.

Por su parte, el estudio llevado a cabo por Almeida et al. (2023) demuestran que ciertos rasgos únicos de la especie de búfalo hacen que sea más difícil aplicar y utilizar esta biotecnología, incluida la incapacidad de detectar el calor y el aprieto para determinar cuándo se debe utilizar la inteligencia artificial. Además, existe escasez de semen de búfalo congelado en el mercado nacional para evaluar los beneficios relativos del uso de semen congelado y refrigerado. Los resultados del estudio muestra que la tasa general de concepción fue del 44,4%, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para las variables del tipo de semen (SR = 57,8 y SC = 31,1 por ciento). Para las variables totales del PPD; DF; MG y toros, no hubo diferencias estadísticas entre los tipos de semen, entre los tipos de semen ($p > 0.05$), obteniendo 41.7, 48.3 y 43.2 por ciento; 45,0 y 44,2 por ciento; 44,3 y 45,0 por ciento; 45,5 y 43,9 por ciento, en ese orden. Se ve por tanto que el uso de RE en los protocolos Ovsynch, la posibilidad de concepción se incrementó en un factor de 2,5 veces más contingencias de riesgo de concepción cuando se usa en protocolos Ovsynch en inseminación (IATF- Ovsynch).

Seguidamente, Almeida et al. (2021) a través de su estudio compararon la eficiencia reproductiva de búfalas lecheras sometidas a inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) mostrando que según el un programa FTAI, el semen refrigerado durante 24 horas aumentó las tasas de embarazo en comparación con el semen congelado, y que, cuando se utiliza semen congelado, las condiciones de puntaje corporal alto reducen las tasas de concepción. Como resultado, el semen de búfalo refrigerado ofrece un sustituto prometedor del semen congelado, ya que es un desafío conservar una tasa de éxito constante y perenne en el reclutamiento de diversos donantes de semen de búfalo; este puede ser un factor limitante para el uso de semen fresco o refrigerado.

Adicionalmente, Villa-Duque et al. (2015) mediante su estudio muestran que al analizar las situaciones de congelación, aplicación de semen y criopreservación a -196°C en 32 granjas bovinas del centro de Colombia, se logró determinar que en todas las granjas evaluadas la inseminación artificial no se practicó correctamente porque se cometieron errores constantemente encontrado en una de las condiciones. De manera que, se pudo comprobar que la técnica de inseminación artificial no se realizó bien en campo

y determinar que las principales causas de la mala calidad del semen fueron el descongelamiento en la axila del inseminador y cualquier cosa que impidiera que los tanques de criopreservación tuvieran suficiente líquido nitrógeno.

Inseminación artificial

Las biotecnologías reproductivas son una serie de técnicas que tienen como objetivo facilitar la obtención de un producto vivo de alto valor (productivo, genético, afectivo), ya que se distinguen de las técnicas genéticas porque no alteran el genoma del animal. Sin embargo, ellas están estrechamente relacionadas. Como concepto general se puede decir que las biotecnologías de la reproducción permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Mellisho et al., 2004).

De igual forma, la eficiencia reproductiva son clasificadas por “Generaciones” que dependen de la época de desarrollo y al grado de complejidad que tienen. Estas pueden ser aplicadas varias a la vez o como única tecnología. Por tanto, Cadena-Villegas y Cortez-Romero (2012) sostienen que la inseminación artificial se utiliza en los programas de superovulación y transferencia de embriones donde se manipuló el ciclo sexual de las hembras para obtener mayor descendencia de las hembras donantes de embriones, tal como se describe en la Figura 1.

Figura 1. Generaciones

GENERACIÓN	Primera	1908
	Segunda Control hormonal de la ovulación	1970 Transferencia de embriones congelación, división 714 356 embriones / año
	Tercera Sexado de embriones y espermatozoides (1983)	1980 Producción <i>in vitro</i> de embriones (1987)
	Cuarta	1990 Clonación con células somáticas (1997)
	Quinta	2000 Transgénesis, Gene Farming

Las diferentes biotecnologías reproductivas son: inseminación artificial, congelación de semen, sincronización e inducción de la ovulación, superovulación, transferencia y congelación de embriones, micromanipulación de embriones para producir mellizos homocigotas y quimeras, determinación y selección del sexo de embriones y espermatozoides, producción *in vitro* de embriones, clonado de animales por medio de transferencia nuclear. Asimismo, de las biotecnologías reproductivas la Inseminación Artificial es una de las primeras en ser desarrolladas, ya que se entiende por Inseminación Artificial (IA) a la colocación manual del semen del macho, de las diferentes especies, en el tracto reproductivo de la hembra, por un método diferente a la cópula. La IA es una técnica dentro de un grupo de tecnología de reproducción asistida, que se denominan biotecnologías reproductivas, y que tienden a facilitar el encuentro de los espermatozoides con el o los ovocitos. (Morell, 2011).

Por ello, la Inseminación Artificial es clasificada como de primera generación, se la ubica a comienzos del siglo XX por el 1908, ya que la motivación mayor de la inseminación artificial a sus comienzos fueron las medidas de higiene, para evitar las enfermedades infecciosas

transmisibles que se dan a través de la cópula. Por tanto, las ventajas productivas fueron vistas rápidamente y la IA fue integrada a los objetivos productivos de los establecimientos pecuarios (Ben et al., 2002).

En los comienzos, la decisión que motivaba la aplicación de la Inseminación Artificial no dependía de razones productivas. En su origen la IA surge como la voluntad de obtener progenie de animales codiciados manipulando lo que se conocería más adelante como semen. Recién en 1784 Lazaro Spallanzani obtiene cachorros después de inyectar semen en una perra en celo (Ávila-Portillo et al., 2006)

La Inseminación Artificial (IA) como técnica reproductiva tiene sus comienzos en los alrededores de 1780 con los trabajos de Lazaro Spallanzani. En 1890 Repiquet en Francia, recomendaba el uso de la IA para contrarrestar la esterilidad. En 1900 se desarrollaron trabajos de inseminación artificial en animales de producción y desde esa época, se piensa en la IA como una herramienta útil en la producción. En Rusia Ivanov trabaja en la producción de vacunos y ovinos (Ax et al., 2000).

En 1930 ya se trabajaba comercialmente y en los 10 años siguientes la técnica se difunde rápidamente. En 1936 Sorensen y Gallinghotmin en Dinamarca organizan la primera cooperativa de IA. En Estados Unidos de América (EUA) comenzaron los trabajos en Minnesota en 1937 y 1938. En ese año (1938) Perry organiza la primera cooperativa de IA de EUA en Nueva Jersey. Lo mismo ocurre en Inglaterra donde se funda el primer centro de IA en Cambridge. En las décadas de 1940 y 1950 se fundan numerosas cooperativas y compañías de IA en todo el mundo difundiéndose rápidamente la técnica (Centro de Inseminación Artificial de Venado Tuerto (CIAVT, 1987).

En 1937 en Dinamarca se desarrolló el método recto vaginal (o recto cervical) lo que produjo una mejora muy importante en los índices de gestación, ya QUE Este método, sin muchas variantes, es el que se utiliza actualmente en la IA en todo el mundo. En 1940 los americanos Phillips y Lardy descubrieron los efectos protectores de la yema de huevo sobre los spz y desarrollaron un diluyente a base de citrato de sodio y yema de huevo, lo que permitió extender el volumen de semen y prolongar su vida útil 48 a 72h (Chemineau et al., 1991).

En 1949 Polge y colaboradores desarrollan un método de congelación de semen incluyendo glicerol en el diluyente. La adición de este componente aparentemente tuvo un origen casual (debido a un error de etiquetado) pero causó un gran avance en la criopreservación de células como los Spz debido a la protección que este ejerce durante la congelación. En los años siguientes se investiga la utilización de diferentes sustancias para mantener la viabilidad de los spz durante la congelación y descongelación (Durán del Campo, 2001).

En 1952 comienzan los trabajos de campo en congelación de semen en dióxido de carbono sólido (hielo seco) a -72 grados centígrados que era lo que se disponía comercialmente por esa época. En 1954, McEntee comunica que el agregado de antibiótico al semen congelado evita la infección con *Campylobacter fetus* a las hembras susceptibles (Perry, 1960).

En 1963, comienzan los estudios de congelación de semen en nitrógeno líquido a temperaturas más bajas (-196°C). En 1964 los japoneses Nagase y Niwa presentaron un método de congelación en pellet o pastillas que básicamente consistía en que una gota de semen diluido (en un diluyente que contiene yema de huevo, citrato de sodio, glicerol y antibióticos) se depositan en huecos hechos en la superficie de piedras de hielo seco o son colocadas sobre un acrílico en los vapores de nitrógeno líquido. El semen así diluido, se congelaba en segundos conservando intacta la movilidad de gran porcentaje de espermatozoides.

Por esa época se congelaba semen en ampollas de vidrio y en los 60s se crea el método de envasado de las pajuelas y el uso de la pistola de inseminación artificial. Si bien el método de envasado en pajuela fue creado en Bélgica el mismo fue desarrollado por Cassou en Francia. Al principio se desarrolla la pajuela 0.50 y posteriormente se desarrolla la pajuela 0.25. Este método permitió abaratar la utilización del semen congelado en varios aspectos. Por una parte la sustitución de vidrio de calidad por plástico, por otra parte la eficiencia de la distribución de temperaturas hizo más eficiente la congelación pues más spz sobreviven y se puede disminuir la cantidad de spz por dosis lo que vuelve más eficiente el sistema al poder obtener mayor cantidad de dosis por eyaculado. Una ventaja adicional es el abaratar el almacenamiento pudiendo aumentar la cantidad de dosis por unidad de almacenamiento (Foote 2002).

En Uruguay comienzan los trabajos de IA con semen fresco en ovinos en la década de 1930. En la década del 1940 el Dr. Juan C. Gutiérrez Fabre realizaba trabajos de inseminación en ovinos y en 1943 el Dr. Jaunsolo realizó los primeros trabajos en vacunos (Viotti, 2011).

En 1952, en la facultad de veterinaria el Dr. Polge da conferencias anunciando el éxito de sus investigaciones, y demostrando que en Inglaterra ya se inseminaba con semen congelado (Duran del Campo, 1993). Esto impulsó la investigación y el desarrollo de trabajos en IA en bovinos. En 1956 se crea una empresa de congelación de semen BASEMCO (Banco de Semen Congelado) que congela y vende semen de bovinos (Centro de Inseminación Artificial de Venado Tuerto (CIAVT, 1987).

Desde 1964 con el aporte de los trabajos de los japoneses Nagase y Niwa (método de congelación en pellets o pastillas) en Uruguay rápidamente se puso en práctica esta técnica y la inseminación tomó nuevo impulso y buenos resultados. Se comenzó a utilizar nitrógeno líquido en bióstatos o bioconservadores. La dificultad estaba dada en que no se autorizaba la importación de los mismos, debiéndose recurrir a importarlos como envases utilizados para la importación de semen (Bonadonna, 1989).

En los 70s se autoriza la importación de bióstatos, pero queda aún la dificultad de la provisión de nitrógeno líquido (NL). En este caso CINOCA S.A. y AGA S.A. (plantas industriales productoras de gases líquidos, entre otros), pasaron de la obtención del NL como subproducto a tenerlo como producción destacado para uso en los conservadores

En 1977 los uruguayos Dr. Rafael Cash y Dr. Aníbal Durán del Campo perfeccionaron el método para congelar pellets de Nagase y Niwa para adaptarlo a la congelación en NL colocando gotas de semen diluido con una jeringa multidosis (usada en IA en ovinos) sobre una superficie de acrílico a una altura de 5cm del N (Durán del Campo, 2001)..

Hasta la década de 1980 solamente se autorizaba la utilización del semen importado a los animales de pedigree debiéndose hacer una declaración de uso de las dosis importadas, ya que la utilización del semen importado no estaba autorizada en el rodeo vacuno general. Además, esta situación era favorable para las cabañas de toros nacionales, pero sustraía a los productores generales (especialmente productores lecheros) el beneficio de la información de comportamiento obtenidas mediante las pruebas de progenie (Bo et al, 2007).

En 1989 se libera la utilización del semen importado a todo el rodeo nacional lo que redundó en un gran aumento de la utilización de la IA especialmente en los tambos. Todo esto facilitado por el impulso que le dio a la IA empresas (como Prolesa y los importadores de semen congelado) que intervinieron en la disminución del costo de los insumos, en la difusión de la técnica y en la capacitación de técnicos inseminadores que trabajan junto con los veterinarios para el desarrollo de la técnica (Llagarias , y Grecco, 2009).

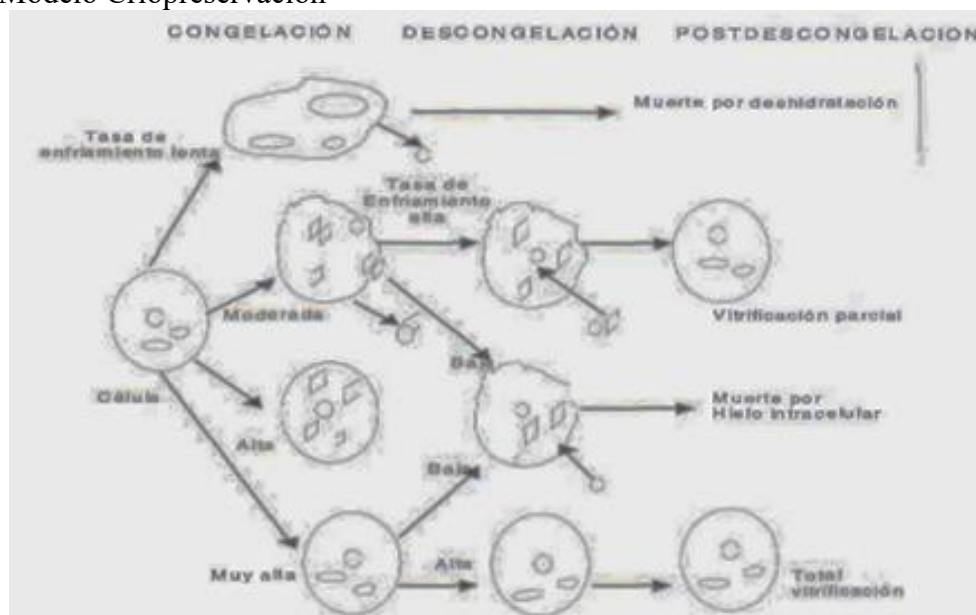
Criopreservación

La criopreservación es la 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 , en la cual se detiene la actividad molecular, logrando la detención de la actividad. Esta biotecnología, asociada a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad, ya que la criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo et al., 2008).

Según Hincapié et al. (2005) se optimizan las condiciones de rutina y no se necesitan medios de conservación si el tiempo entre la recolección de embriones y la transferencia se puede acortar en una o dos horas. Sin embargo, si el intervalo es superior a seis a doce horas, se deben utilizar medios de cultivo. Se mantienen entre 0 y 4°C con porcentajes de gestación normales después de un período de 24 a 36 horas.

De manera que, el objetivo fundamental de la criopreservación es detener el metabolismo durante un período de tiempo no especificado mientras los embriones se encuentran en anabiosis sintética (vida latente), ya que los momentos más importantes y delicados durante la criopreservación son cuando la muestra se congela y descongela. Durante estos tiempos, un sinnúmero de procesos físico-químicos están controlados por las diferencias de temperatura y el movimiento del agua entre el medio de la muestra y las células. Sólo se puede obtener con un crioprotector y procedimientos de congelación específicos para conservar sus propiedades como metabolismo y capacidad de crecimiento (Gorlach, A, 1998).

Figura 1. Modelo Criopreservación



Fuente: Tomado de Jamieson (1990).

Curvas en proceso de congelación

La suspensión de esperma se somete a un sobreenfriamiento, o la temperatura desciende por debajo del punto de congelación del medio, durante el proceso de

criopreservación, antes de la formación de cristales. El aumento de la temperatura necesaria para la cristalización que se produce cuando se empiezan a formar cristales de hielo puede ser perjudicial para los espermatozoides, aunque se puede reducir utilizando las curvas de congelación adecuadas (Squires, 1999). La rápida pérdida de agua, que provoca la deshidratación celular y un aumento de la concentración de solutos extracelulares, ocurre cuando el proceso de congelación es muy lento. Esto da como resultado la congelación del agua extracelular con la consecuente concentración del soluto, colocando temporalmente a la célula en un medio hipertónico. Por el contrario, no hay pérdida de agua cuando una célula se congela rápidamente, lo que favorece el crecimiento de cristales de hielo intracelulares (Mazur, 1985).

El agua intra y extracelular permanece sobreenfriada y no cristalizada por debajo de los 5°C. La deshidratación celular resulta del intercambio de agua para mantener el equilibrio entre el medio intra y extracelular, pero a temperaturas entre -5 y -10°C, comienzan a formarse cristales de hielo en el medio extracelular que aún está extremadamente frío. La curva de congelación debe ser lenta en este punto para evitar la congelación del agua intracelular y lo suficientemente rápida para evitar el contacto entre la célula deshidratada y el medio hiperosmótico. La deshidratación extrema fomenta la desnaturalización de las macromoléculas y la contracción celular excesiva, lo que provoca el colapso de la membrana celular. (Medeiros, 2002). La deshidratación de la célula y la pérdida de agua son procesos ventajosos porque disminuyen la probabilidad de formación de grandes cristales de hielo dentro de la célula, que podrían dañar la membrana plasmática u otros componentes internos (Squires, 1999).

Dependiendo de cómo se congeló el semen, existen diferentes procedimientos de descongelación, ya que se necesitan curvas suficientes para que los espermatozoides congelados en curvas moderadas se descongelen. En este caso, el soluto de las fracciones de agua no congeladas se diluye gradualmente a medida que el hielo extracelular se descongela, permitiendo que el agua se difunda gradualmente dentro de la célula y diluya el soluto intracelular a su concentración original. Si los espermatozoides se descongelan rápidamente, el hielo se derretirá rápidamente, diluirá el soluto y el agua entrará rápidamente en los espermatozoides, volviéndolos altamente concentrados y dañados (Graham, 1996).

Para lograr una mayor tasa de fertilidad utilizando menos espermatozoides por inseminación e inseminaciones, es fundamental que la muestra de semen esté adecuadamente diluida. Esto permitirá que los espermatozoides quepan en una pajita de inseminación. Pero basándose en el conocimiento de la concentración de espermatozoides, ésta debe medirse correctamente (Ritar et al., 1990). Según Chemineau et al. (1991), El diámetro de la pajita debe determinar qué tan alto está por encima del nitrógeno líquido. Se recomendó refrigerar pajitas de 0,5 ml a un nivel de nitrógeno líquido de 4 cm durante 5 minutos. y sumergido en nitrógeno líquido, con las pajitas de 25 ml de punto 0 sumergidas durante dos minutos a 16 cm por encima del nitrógeno líquido. Se redujo a 4 cm durante 3 minutos. para ser almacenado y luego sumergido en nitrógeno líquido. Los congeladores programables no sólo pueden regular la velocidad de congelación, sino que también son útiles para la congelación a granel de pajitas de semen.

Una ventaja de muchos congeladores programables es que puedes programar la curva de enfriamiento para que vaya, por ejemplo, de 4 a -5°C durante 4 minutos, durante 25 minutos, entre -5 y -110 °C. y 35 minutos entre -110 y -140 °C. Sólo entonces se sumergen las pajitas de semen en nitrógeno líquido (Purdy, 2006).

Evaluación de semen

Se ha intentado predecir la fertilidad de los machos a través del estudio seminal, pero la fertilidad, definida como la capacidad transitoria de lograr gestaciones, está lograda por diferentes parámetros tanto físicos como fisiológicos y comportamentales. La fertilidad de los machos es un tema complejo que depende de una población heterogénea de spz interactuando en varios niveles en el tracto genital de la hembra, los alrededores del ovocito y el ovocito mismo. Por esta razón los análisis del semen deberán incluir el chequeo de muchos de los atributos que sean relevantes para la fertilización y el desarrollo embrionario. Deberá ser evaluada a distinto nivel; a nivel de cada uno de los spz y de una gran población de spz. (Larocca , y Filipiak, 2017).

Se propusieron pruebas de evaluación procurando una sistematización del examen de aptitud reproductiva potencial, considerando tanto el examen clínico general y particular del aparato reproductor, el examen de semen y la prueba de habilidad de monta para poder seleccionar toros potencialmente aptos para la reproducción. Estas miden una serie de factores como: la sanidad de los toros, la existencia de patologías de su aparato genital, la capacidad de los machos de reconocer las hembras susceptibles, realizar la cópula y eyaculación en condiciones satisfactorias y de contar con semen de aspectos considerados como aptos.

Pero la fertilidad final o real, debería ser evaluada en pruebas de campo estudiando el comportamiento de los toros en un servicio de hembras vírgenes (test de la vaca virgen) en un ciclo completo de celos de 21 días. La forma más precisa para estimar la fertilidad del semen sería poder realizar estudios in vivo evaluando la de tasa de no retorno, sin embargo, no siempre es posible realizar este tipo de pruebas, dado que este método es incompleto, pues la fertilidad es producto de la interacción de los dos reproductores teniendo que tomar en consideración además la fertilidad de las hembras involucradas (Amann y DeJarnette, 2012).

En conclusión, las pruebas (o test) de aptitud reproductiva nos informan acerca de toros que son potencialmente aptos para reproducirse y no garantizan la fertilidad (que depende además de otros factores como los factores genéticos propios del animal cuya evaluación es dificultosa).

La importancia de las pruebas de aptitud reproductiva constituye un gran aporte a la mejora de la eficiencia reproductiva, ya que dentro de las pruebas realizadas en la evaluación de la aptitud reproductiva se encuentra el estudio seminal o espermiograma. Además, la fertilidad de una muestra de semen depende de dos factores: de la calidad del semen y el número de espermias normales (Saacke et al. 2000).

Por tanto, el objetivo de la evaluación de semen es el de predecir la capacidad fecundante del mismo lo más acertadamente posible y para ello se diseñaron numerosas pruebas o sistemas de evaluación, dado que existe una conexión entre la fertilidad del semen y sus propiedades medibles. El alcance de estas pruebas no es la predicción precisa de la fertilidad, aunque por este medio, se pueden distinguir muestras problemáticas de otras consideradas “normales” (Holt y Van Look, 2004)

Se estableció que, una vez alcanzado un límite óptimo en la valoración del semen, el incremento posterior de los mismos parámetros no produciría un incremento paralelo en la fertilidad. Por tanto, se pueden establecer diversos valores que se sugieren como límites mínimos que debe cumplir un toro para ser considerado portador de una fertilidad potencial aceptable, ya que se sugiere la existencia de un paso para la fecundidad (Salisbury et al. 1978).

La valoración seminal puede ser diferenciada de acuerdo a la aplicación de las tecnologías disponibles, en una valoración de campo, en la que se estudian algunos parámetros con una

tecnología sencilla (microscopio óptico o MO con contraste de fase), o en una valoración más especializada en la que se estudian en laboratorios con mayor tecnología (CASA).

La mayor parte de los estudios utilizan evaluaciones sencillas microscópicas de los parámetros espermáticos, incluyendo la concentración de espermatozoides, motilidad, morfología y viabilidad (Januskauskas y Zilinskas, 2002). Para el examen o valoración de semen se propuso la evaluación de los siguientes parámetros (INIA)

1. Volumen
2. Aspecto
3. Densidad (concentración)
4. pH
5. Motilidad en masa
6. Motilidad Individual (% de vivos)
7. Test de Schalm
8. Frotis puros (azul de metileno) para apreciación de leucocitos
9. Coloración vital (eosina nigrosina)
10. Muestras fijadas con formol salino bufferado
11. Otras tinciones como Giemsa, Galloway.

Se han agregado otras pruebas como el HOST (test hipo osmótico) y Test de termo resistencia que se aplica usualmente para semen congelado – descongelado, ya que la determinación del espermiograma ha sido históricamente un procedimiento altamente subjetivo (realizado manualmente por un técnico entrenado y calificado, a partir de la observación visual de la muestra al microscopio) y asociado a una considerable variabilidad en los resultados.

De manera que, esto provoca que sea difícil comparar las evaluaciones realizadas por diferentes laboratorios, al tiempo que la fiabilidad de los resultados se ve muy reducida. El análisis depende de las habilidades, conocimientos y experiencia del técnico que realiza los ensayos contando con un factor de subjetividad considerable.

Materiales y métodos

Preparación del material seminal

Se utilizó un único toro al que se le realizó examen andrológico completo previo al comienzo del trabajo. Para la recolecta del semen se utilizó el método de electroeyaculación. Para ello se dispuso de un electroeyaculador Lane Pulsator IV—Auto Adjust TM con ciclo de estimulación automático. Se realizaron dos colectas separadas 15 minutos entre sí y el resultado de las mismas se mezcló en un tubo para conformar un volumen seminal único.

Para la dilución se utilizó el diluyente AndroMed® (Minitüb GmbH) (poner la ciudad y Germany). El material colectado se diluyó con un único diluyente.

A la primera fracción (Semen congelado SC) se la diluyó 1:8 ajustando la dosis inseminante a 25×10^6 spz en pajuelas de 0.5 ml. Para la congelación se utilizó el método estándar de congelación, congelándose en vapores de nitrógeno líquido.

Para la utilización, el semen fue descongelado de a una pajuela en baño de María a 35 grados centígrados durante 30 segundos.

La inseminación fue realizada inmediatamente después de la descongelación

La fracción de semen fresco (Semen enfriado SE), fue procesada con el mismo diluyente AndroMed® (Minitüb GmbH), se ajustó a la misma dosis inseminante y se lo mantuvo en refrigeración (temperatura de heladera 4-7°C) hasta su utilización.

Todo el material fue usado dentro de las 24 horas de producido. Todas las inseminaciones fueron realizadas por el mismo operador.

Preparación del rodeo de vaquillonas

Se realizó el examen ginecológico a 97 vaquillonas y vacas de raza cruce Wagyu por Aberdeen Angus, para verificación de ciclicidad de acuerdo al score de Anderson. Las vaquillonas seleccionadas, con condición corporal de 4 a 4.5 (escala de 1 a 8) se las incluyó en un protocolo de sincronización de ondas foliculares de acuerdo al siguiente protocolo:

Día 0 Colocación de Cidr B + Benzoato de estradiol

Día 7 Retirada de CIDR® + 2ml de Prostaglandina F2 α (500 μ g de Cloprostenol, Estrumate® MSD Animal Health) + 200UI de eCG (NOVORMON® 5000 Syntex) + 1 ml cipionato de estradiol (0.5 mg 17 Beta estradiol CIPIOSYN® Syntex)

La Inseminación Artificial se realizó a tiempo fijo a las 52 horas de retirados los implantes

La preñez se determinó mediante ultrasonografía transrectal entre los 30 y 40 días de realizada la IA. Para ello se utilizó un equipo WellD 3000V (Shenzhen Well.D Medical Electronics China) con transductor transrectal de 6.5 mhz.

La alimentación de las vaquillonas fue a campo natural. Silvopastoreo. Las condiciones de campo no eran las mejores, hubo sequía por eso su condición corporal no era la más adecuada.

Se procedió a la inseminación 22hs después de su primer celo.

Teoría: semen fresco fertiliza ovulaciones tardías porque tiene mayor vida útil que el congelado (congelado dura más o menos 10hs dentro de la vaca).

A tener en cuenta en la discusión: misma dosis inseminante para refrigerado y Congelado Se tendría que haber equiparado las dosis diluyendo más al refrigerado o aumentando la dosis del congelado, para mantener una igualdad al momento de la inseminación. Supuestamente se usó 40 millones tanto para congelado como para refrigerado.

Se utilizó un solo eyaculado 50% dosis fue refrigerado y 50% dosis congelada.

Se utilizó un solo toro lo que ayuda al momento de comparar congelado y refrigerado ya que se elimina la variable de fosfolípido tanto en cantidad como el tipo flagelar, sin embargo, que un spz esté vivo y se mueva, no necesariamente garantiza que esa célula sea fértil. La integridad del material genético en la cromatina del spz.

Se evaluó los registros de un trabajo realizado en el año 2019 en el establecimiento “El Mirador de la Virgen”, ubicado en el km. 245 de la Ruta 3, Departamento de Soriano.

Se analizó los datos de preñez de una IATF realizada y de valoración de semen refrigerado con el fin de probar sus ventajas frente al semen congelado. Se inseminó un rodeo de 97 vaquillonas Wagyu púberes, de año y medio de edad, con un peso promedio de 290-320 Kg, presentando una condición corporal entre 4 y 5 en una escala del 1 al 8, siendo el 1 una vaca en estado de emaciación y el 8 en estado de obesidad (Méndez et al., 1988).

La inseminación se hizo con semen proveniente de una única colecta obtenida por electroeyaculación de un toro utilizado con anterioridad en el mismo establecimiento con resultados positivos en IATF con semen congelado. Al mismo se le realizó un examen clínico andrológico 60 días previos a la IATF y presentó un resultado como potencialmente apto.

Se preparó diluyente AndroMed® (Minitube GmbH) agregando 800 ml de agua bidestilada a 35°C a la solución concentrada, que contiene el frasco de origen (previamente atemperado a 35°C, en una probeta de 1000ml agitando lentamente hasta lograr una mezcla homogénea (AndroMed®). Siendo mantenido a 35°C hasta su uso. A la colecta de semen obtenida se le agregó el diluyente previamente preparado en 1:1 volúmenes, se realizó un espermograma para

valorar el eyaculado, hasta llegar a una dilución final con una concentración de 30 millones de espermatozoides totales por dosis en pajuelas de 0,5 mL. Una fracción corresponde a semen refrigerado (SR), la misma fue mantenida en refrigeración hasta la IA. La otra fracción corresponde a semen congelado (SC) y se la sometió a un protocolo de criopreservación (protocolo Andromed®).

Las vaquillonas fueron sometidas a un protocolo de IATF. El tratamiento de IATF (De nava, G. 2013) que se aplicó a los animales consta de la inserción de un dispositivo intravaginal (DIV) impregnado con 750 mg de progesterona (Dispocel, Syntex. Buenos Aires, Argentina) y a la vez se aplicó 2 mg de Benzoato de Estradiol (BENZOATO DE ESTRADIOL FEDAGRO, FATRO FEDAGRO SRL) vía intramuscular (Día 0 de protocolo). El DIV se retiró al día 7 del protocolo y se les aplicó 150 mg de D- Cloprostenol (Estrumate, MSD Animal Health), un miligramo de Cipionato de Estradiol Von Franken (FATRO FEDAGRO SRL) y 300 UI de Gonadotrofina coriónica equina vía muscular (Novormon, Syntex. Buenos Aires, Argentina).

El día 9 del protocolo, se realizó IATF con ambas fracciones de semen al azar, se obtuvieron un grupo de SR (n= 49) y otro de SC (n= 48). El SC se descongeló 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 refrigerada a 5°C, las pajuelas se sacaban de la conservadora y se cargaban directamente en el aplicador para inseminar en el momento.

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

Luego de la inseminación artificial se evaluaron las muestras de SR, se realizó un Test hiposmótico (HOST), sometiendo a los espermatozoides a un medio hipoosmótico provocandoles un desequilibrio osmolar entre el medio intracelular y extracelular. Los espermatozoides que tienen membrana íntegra y funcionalmente activa se verán con la cola enrollada, en comparación a los espermatozoides que presentan la cola recta indicando el daño y falla en la funcionalidad de membrana. Esta misma técnica consiste en incubar 5 µl de semen con 45 µl de agua bidestilada de osmolaridad 0 mOsm/L, durante 5 minutos a 37 °C. Las soluciones hipoosmóticas fueron previamente templadas a 37 °C en baño maría, midiéndose su osmolaridad con un osmómetro digital (Sánchez et al., 2016). Una de las dosis de SC se analizó post-descongelación para la evaluación de los parámetros habituales del semen.

Se realizó un tests de termorresistencia al SR y se le realizará este test al SC. El test de termorresistencia espermática es utilizado para poder determinar el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático (Catena, M. et al.,1999). Dicho procedimiento consiste en esperar que la muestra de semen llegue a 37 °C y se coloca en un tubo de falcón de 15ml la muestra a valorar, elegida al azar. Las lecturas de cada muestra se realizan, enseguida del comienzo del test y a los 30, 60, 90 y 120 minutos, sobre una platina térmica a 37 °C (Fleitas et al. s.f.). Su variable es cuantitativa en el tiempo, fue evaluada directamente la dosis. Los datos de variables cualitativas obtenidos se analizaron mediante Chi Cuadrado.

Resultados

En el siguiente acápite se describe los datos evaluarlos con estadística de chi cuadrado y tomando en consideración el % Preñadas Total. .1. Además, se describe la diferencia entre el uso del semen congelado/descongelado y el refrigerado en la tasa de preñez en vaquillonas sometidas a un protocolo de IATF.

Tabla 1. Uso del semen congelado/descongelado y el refrigerado en la tasa de preñez.

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	62.087	1	0.000
Razón de verosimilitud	65.216	1	0.000
Asociación lineal por lineal	61.447	1	0.000
N de casos válidos	97		

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 1 muestra que se han esperado un recuento menor que 5, con significancia de ($P < 0,05$) existiendo una asociación entre el semen congelado/descongelado y refrigerado y es estadísticamente significativa.

Por otro lado, la Tabla 2 describe la diferencia entre el semen congelado/descongelado y refrigerado sobre la integridad de membrana del espermatozoide.

Tabla 2. Semen congelado/descongelado y refrigerado sobre la integridad de membrana del espermatozoide.

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	41.869	1	0.000
Razón de verosimilitud	45.804	1	0.000
Asociación lineal por lineal	41.438	1	0.000
N de casos válidos	97		

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 3 muestra un recuento menor que 5, con significancia de ($P < 0,05$) existiendo una asociación entre el semen congelado/descongelado y refrigerado sobre la integridad de membrana del espermatozoide y es estadísticamente significativa.

Por otro lado, la Tabla 3 y Figura 2 muestran el resultado de la Ecografía del Grupo Semen Fresco y Congelado con un % Preñez Total de 0.54%, Congelado Preñados 0.42% y Congelado Vacías 0.58%. Por otro lado, Fresco Preñadas 0.65% y Fresco Vacías 0.35.

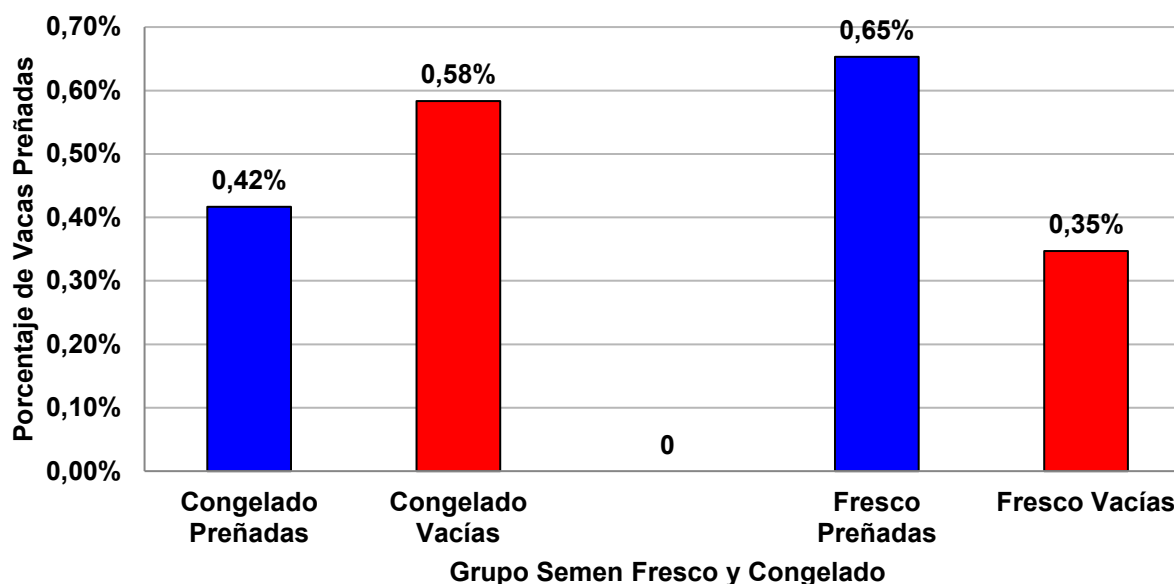
Tabla 3. Ecografía del Grupo Semen Fresco y Congelado

Tot Vq	97
Vq insem cong	48
Vq insem fresco	49

% Preñ tot	0.54%
Congelado Preñadas	0.42%
Congelado Vacías	0.58%
Fresco Preñadas	0.65%
Fresco Vacías	0.35%

Fuente: Elaboración propia

Figura 2. Ecografía del Grupo Semen Fresco y Congelado



Fuente: Elaboración propia

Discusión

Se ejecutaron diversos ensayos cotejando semen congelado/descongelado y refrigerado en un protocolo de IATF. La investigación realizada por Papa *et al.* (2015), en comparación con los grupos de semen congelado y semen fresco sin crioprotector, los grupos que fueron inseminados con semen fresco con crioprotector mostraron valores notablemente más altos.

En el trabajo realizado también se encontraron diferencias a favor del semen fresco por los autores Borges-Silva *et al.* (2015) donde el esperma fresco aumentó el embarazo en un 105 por ciento más que el esperma congelado o descongelado. En rebaños comerciales, utilizando vacas secas, novillas y vacas con terneros al pie, Lopepe (2015) comparó semen fresco y congelado/descongelado, ya que en esta investigación, el porcentaje de preñez obtenido utilizando semen fresco (66,1%) fue mayor ($P < 0,05$) que el obtenido con semen congelado (55,2%).

Por su parte, Almeida *et al.* (2021) mediante su estudio extrajeron eyaculados de ocho toros Murrah mediante una vagina artificial y concluyeron que en búfalas lecheras bajo la IATF P4/E2 y eCG durante la época reproductiva desfavorable, el semen refrigerado produjo mayor CR que el semen congelado. De igual forma, Flores-Padilla *et al.* (2017) demostraron que

el apareamiento natural y la inseminación artificial resultaron en el 50% y el 83,3 por ciento de las veces, respectivamente, en el ensayo 1, sin diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de embarazo por inseminación artificial y apareamiento natural en el ensayo 2 ($P>0$ punto 01).

De igual forma, Villa-Duque et al. (2015), demuestran que la integridad acrosómica (IAs) y la integridad estructural de la membrana espermática (IEM) fueron afectadas ($P<0,05$) por la interacción genotipo x técnica instrumental. La resistencia de las membranas espermáticas fue afectada ($P<0,01$) por el genotipo y la técnica instrumental. Los valores más bajos para integridad y resistencia de membranas correspondieron al semen de Pardo Suizo descongelado en la axila y almacenado con bajo nivel de nitrógeno. A pesar de que los porcentajes de gotas citoplásmicas y colas en látigo ($<7\%$ y $<11,3\%$, respectivamente) fueron superiores a lo esperado, el porcentaje de espermatozoides normales estuvo siempre por encima del 70%, indicativo de que ninguno de los factores evaluados afectó de manera determinante la morfología espermática.

Seguidamente, Rodrigues y Valenzuela (2019), los hallazgos demostraron que, si bien el diluyente a base de lecitina de soja fue capaz de mantener la integridad de la membrana acrosómica de manera más efectiva ($92,37 \pm 0,90$; $89,54 \pm 1,07$; $p=0,04$), también mostró un mayor número de defectos en los espermatozoides. En total ($10,92 \pm 0,97$; $6,62 \pm 0,83$; $p=0,0008$), el período de refrigeración que redujo significativamente la motilidad, el vigor, la integridad de la membrana y la actividad mitocondrial de los espermatozoides fue de 48 horas. La tasa de embarazo registrada en el estudio fue del 15% para el grupo de lecitina, del 14% para el grupo de yema de huevo y del 13% para el grupo de control; no hubo diferencias perceptibles entre los grupos ($p>0,05$).

En este experimento sólo se obtuvieron algunas diferencias numéricas que no alcanzaron la significación estadística, a pesar de que los resultados presentados en los párrafos anteriores muestran diferencias significativas descubiertas a favor del semen fresco.

Conclusiones

La presentación de los resultados muestra que se han esperado una significancia de ($P<0,05$) existiendo una asociación entre el semen congelado/descongelado y refrigerado y es estadísticamente significativa. Además, muestra una significancia de ($P<0,05$) entre el semen congelado/descongelado y refrigerado sobre la integridad de membrana del espermatozoide y es estadísticamente significativa.

De manera que, el resultado de la Ecografía del Grupo Semen Fresco y Congelado con un % Preñez Total de 0.54%, Congelado Preñados 0.42% y Congelado Vacías 0.58%. Por otro lado, Fresco Preñadas 0.65% y Fresco Vacías 0.35%. El porcentaje de preñez no se ve afectado por el tipo de semen presentado en los programas AITF (fresco o congelado/descongelado); sin embargo, se deben tratar más animales en estos estudios para validar los hallazgos.

Los hallazgos del experimento muestran que la integridad de estas membranas se ve afectada por el proceso de congelación y descongelación en términos tanto de funcionalidad como de morfología, ya que fue factible mostrar cómo el esperma de cada uno de las vaquillonas evaluadas resistió la criopreservación de una manera única.

Además, el estudio también demuestra que el daño criogénico puede afectar igualmente la integridad estructural y funcional de las vaquillonas, lo que puede tener un impacto en la capacidad de fertilización de las muestras seminales destinadas a la inteligencia artificial (IA).

Referencias bibliográficas

- Almeida, J., Brito, M., Neves, B. Becerra, V. A., Auler, P. A., Hadad, J. P., Baruselli, P. y Henry, M. (2023). Uso de sêmen resfriado de búfalo como estratégia para aumentar as taxas de concepção em programas de inseminação artificial em tempo fixo, durante períodos reprodutivos desfavoráveis. *Ciência Animal e Veterinária: tópicos atuais em pesquisa*, 1, 122-139. DOI.10.37885/230212137
- Almeida, J., Brito, M.F., Neves, B.P., Becerra, V.A.B., Auler, P.A., Hadad, J.P., Baruselli, P.S. y Henry, M. (2021). Use of cooled buffalo semen as a strategy to increase conception rates in fixed-time artificial insemination programs during unfavorable reproductive periods. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 73(3), 560-570.
- Amann, R.P. y DeJarnette, J.M. (2012). Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. *Review. Theriog.* 77, 795– 817.
- Ávila-Portillo, L.M.; Madero J.I.; López, C.; León M.F.; Acosta L.; Gómez C.; Lozano, J.M. y Reguero, M.T. (2006) Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57, 291-300.
- Ax, R.L.; Dally, M.R.; Didion, B.A.; Lenz, R.W.; Love, C.C.; Varner, D.D.; Hafez, B. y Bellin M.E. (2000). Inseminación artificial. En: Háfez, E.S.; Háfez. B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ªed. México, McGraw-Hill Interamericana pp. 387-400.
- Ben, G.A., Goitia, O.E., Mujica, I.F., Munar, C.J. y Valdez, A.M. (2002). Programa de inseminación artificial a tiempo fijo. Manual de procedimientos. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/15-programa_inseminacion_a_tiempo_fijo.pdf.
- Bó, G.A., y Baruselli, P.S. (2002). Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en el ganado bovino en regiones subtropicales y tropicales. En: C. González-Stagnaro et al., editores, Avances en la ganadería doble propósito. Fundación Girarz, Maracaibo, VEN. p. 499-514.
- Bo, G.; Cutaia, L. y Veneranda, G. (2007). Semen sexado, una herramienta tecnológica para el tambo. (en línea). *Producir* XX, 15, 52-57.
- Bonadonna, T. (1989) Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Buenos Aires, Tomo I. Hemisferio Sur., 286 p.
- Borges-Silva, J.C., Silva, M.R., Marinho, D.B., Nogueira, E., Sampaio, D.C., Oliveira, L.O.F., Abreu, U.G.P., Moura, G. B., y Sartori, R. (2015). Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RD14185>.
- Castelo, T.S., Frota, T.R. y Silva, A.R. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*, 2, 67-75.
- Centro de Inseminación Artificial de Venado Tuerto (CIAVT) (1987). Manual de Inseminación. 3ª ed. Buenos Aires, Centro de Inseminación de Venado Tuerto. 167p.
- Chemineau, P.; Cagnie, Y.; Guerin, Y.; Orgeur, P. y Vallet, J.C. (1991). Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v3_n2_jun/tca10_esperma.pdf
- Durán del Campo, A. (2001) Historia de la inseminación artificial en vacunos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 36 Suplemento: 5-23.

- Flores-Padilla, J.P., Toscano-Torres, I.A., Núñez-Anita, R.E., Tena-Martínez, M.J., Val-Arreola, D. y Olivo-Zepeda, I.B. (2017). Evaluación de la utilización de semen congelado y refrigerado en la inseminación artificial por laparoscopia en la especie ovina. *AICA*, 9, 41-47
- Foote, R. H. (2002) The history of Artificial Insemination: Selected Notes and Notables. American Society of Animal Science.
- Gorlach, A. (1998). Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Editorial. Acribia, SA, Nueva York. p. 66-79.
- Graham, J.K. (1996) Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12, 131-147.
- Hincapie, J.J., Brito, R. y Campo, E. (2005). Reproducción animal aplicada: Fundamentos de fisiología y biotecnología. Tegucigalpa, Honduras. p. 141-142.
- Holt, W.V. y Van Look, K.J.W., 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, 127, 527-535.
- Horan, B. y Roche, J. R. (2019). Defining resilience in pasture-based dairy-farm systems in temperate regions. *Animal Production Science*, 60(1), 55-66. <https://doi.org/10.1071/AN18601>
- Januskauskas, A. y Žilinskas, H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika*, 17 (39).
- Larocca, C. y Filipiak, Y. (2017). Semen bovino sexado congeladodescongelado en producción de embriones *in vitro*. *Int. J. Morphol.*, 35(1), 371375.
- Llagarias, A. y Grecco, M. (2009). Caracterización de las ventas de semen de la raza Holando de Prolesa. Disponible en: https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23892/1/TTS_LlagariasBoggioAndr%C3%A9s.pdf
- Lopepe, H. E. (2015). Comparación entre el uso de semen fresco versus congelado en programas de IATF. Trabajo Final para optar al Grado Académico de Especialista en Reproducción Bovina. Universidad Nacional de Córdoba. IRAC, 24 páginas.
- Mazur, P. (1985) Basic concepts in freezing cell. En: Johnson, L.A.; Larsson, K. Deep freezing of boar semen. Proceeding. International Conference Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala, SLU. pp.91-111.
- Medeiros, C.M.; Forell, F.; Oliveira, A.T. y Rodrigues, J.L. (2002) Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57:327-344.
- Mellisho, E. Gallegos, A. y Alvarado, E. (2004). Reproducción e Inseminación Artificial en ovinos, Perú-UNALM, pp. 29-30.
- Morell, J.M. (2011). AI in farm animals, 1-14. DOI: 10.5772/17943
- Morrow C.J., Penfold L.M. y Wolfe, B.A. (2009). Artificial insemination in deer and non-domestic bovids. *Theriogenology*. 71, 149-165
- Niemann, H. y Seamark, B. (2018). The Evolution of Farm Animal Biotechnology. In *Animal Biotechnology I*, 1-26.
- Papa, P.M.; Maziero, R.D.; Guasti, P.N.; Junqueira, C.R.; Freitas-Dell'Aqua C.P. Papa, F.O.; Vianna, F.P.; Alvarenga, M.A.; Crespilho, A.M. Dell'Aqua Jr, J.A. (2015). Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*. 83, 107-113.

- Perry, E. (1960) *The Artificial Insemination of Farm Animals*. 3a. ed. Rutgers University Press. New Brunswick, 430 p.
- Purdy, P.H. (2006) A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63, 215-225.
- Ritar, A.J.; Ball, P.D. y O'May, P.J. (1990) Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development* 2:27-34.
- Rodrigues, M. D. P. y Valenzuela, M. S. (2019). Efecto del semen refrigerado sobre la calidad espermática y tasa de preñez en ovinos. *Revista Científica Estudios E Investigaciones*, 8, 205–206. <https://doi.org/10.26885/rcei.foro.2019.205>
- Saacke, R.G., Dalton, J.C., Nadir, S., Nebel, R.L. y Bame, J.H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.* 6061, 663667.
- Salisbury, G.W., VanDemark, N.L. y Lodge, J.R. (1978). *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Principles and techniques of freezing spermatozoa*. (2ed). Freeman and Company. San Francisco. pp. 494-554.
- Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; McCue, P.M. y Bruemmer, J. (1999) Cooled and frozen Stallion Semen. 9º *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin*, 80 p.
- RumiNews (2020). Reproducción: ¿semen fresco o semen congelado? Disponible en: <https://rumiantes.com/reproduccion-semen-fresco-semen-congelado/>
- Villa-Duque, N., Valencia-Giraldo, J., Gómez-Londoño, G. y Henao-Urbe, F. (2015). Efecto de los errores en la inseminación con semen congelado sobre la morfofisiología espermática bovina. *ORINOQUIA*, 19(2), 46-55.
- Viotti, P. (2011). Procesamiento de semen bovino para la inseminación artificial. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19819/1/FV-29377.pdf>