

Rossi, Alejandro

Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Rossi, A. 2012. Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en:
<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efecto-refrigeracion-adicion-trehalosa-parametros.pdf> [Fecha de consulta:.....]



UCA

Facultad de Ciencias Agrarias

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

“Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino”

**Trabajo final de graduación para optar por el título de:
Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: Rossi Alejandro, N° de Registro: 05-070036-3

Profesor Tutor: Médico Veterinario Eduardo Martínez

Fecha: Julio de 2012

Resumen

El objetivo de la siguiente investigación fue evaluar la viabilidad in vitro del semen bovino diluido y refrigerado a 5-7°C, mediante monitoreo dinámico de parámetros microscópicos a través del tiempo (0, 6, 12, 24, 48 y 72 hs). Además, se ha buscado comparar la viabilidad in vitro del semen diluido y refrigerado con y sin el agregado de trehalosa. A través de este estudio se ha buscado conocer durante cuánto tiempo puede conservarse el semen refrigerado hasta su utilización sin verse afectada la capacidad fecundante del mismo, permitiendo lograr adecuados porcentajes de concepción en un programa de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). En otras palabras, se buscó determinar momentos óptimos para inseminar con semen refrigerado. En cada tiempo de monitoreo se evaluó motilidad masal (MM), motilidad individual progresiva (MIP) y porcentaje de espermatozoides vivos (%vivos). Los resultados obtenidos marcaron tendencias similares para todos los parámetros evaluados (MM, MIP, %vivos). Se obtuvieron los valores más bajos para el tratamiento con trehalosa, siendo marcadamente inferior a los otros dos tratamientos en todos los momentos analizados. A su vez, el tratamiento control y el refrigerado, reflejaron resultados similares hasta las 24 horas, y entre las 24 y 72 horas mantuvo mejores resultados el tratamiento refrigerado, mientras los parámetros analizados en el tratamiento control disminuyeron de manera abrupta.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Importancia de la inseminación artificial en mejoramiento genético y manejo reproductivo bovino	
2.1.1 <i>.La inseminación artificial</i>	7
2.1.2 <i>.Ventajas de la inseminación artificial</i>	8
2.1.3 <i>.Desventajas de la inseminación artificial</i>	9
2.2. Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)	
2.2.1 <i>.Generalidades</i>	9
2.2.2 <i>.Protocolos de IATF</i>	10
2.2.3 <i>.Resultados IATF</i>	11
2.2.4 <i>.Ventajas de su implementación</i>	11
2.2.5 <i>.Desventajas</i>	12
2.3. Conservación de semen bovino y su utilización en combinación con IATF	
2.3.1 <i>.Temperaturas de conservación del semen</i>	12
2.3.2 <i>.Ventajas y desventajas de los métodos de conservación</i>	13
2.3.3 <i>.Utilización de semen refrigerado y congelado en el mundo</i>	14
2.3.4 <i>.IATF con semen refrigerado y congelado</i>	14
2.3.5 <i>.Cantidad de espermatozoides necesarios para inseminar</i>	16
2.3.6 <i>.Características del proceso de refrigeración y congelación. Efectos sobre las células espermáticas</i>	17
2.4. Diluyentes utilizados para la conservación de semen	
2.4.1 <i>.Características que debe reunir un diluyente</i>	21
2.4.2 <i>.Composición del diluyente</i>	21
2.4.3 <i>.Composición de diluyentes para almacenamiento a 5°C</i>	

<i>y temperatura ambiente</i>	21
2.4.4. <i>Sustancias para mantener el pH y la capacidad tampón</i>	22
2.4.5. <i>Crioprotectores</i>	23
2.4.6. <i>Sustancias orgánicas protectoras contra el shock de frío</i>	23
2.4.7. <i>Adición de azúcares como crioprotectores</i>	24
2.4.8. <i>Trehalosa. Características generales</i>	24
2.4.9. <i>El uso de trehalosa para la conservación de semen</i>	26
2.4.10. <i>Resultados de ensayos evaluando la acción de la trehalosa</i>	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. <i>Información general del ensayo</i>	29
3.2. <i>Método de colección de los eyaculados</i>	30
3.3. <i>Preparación de los diluyentes</i>	30
3.4. <i>Preparación de la muestra heteroespermática</i>	32
3.5. <i>Separación en tratamientos</i>	33
3.6. <i>Métodos de evaluación de viabilidad in vitro</i>	35
3.7. <i>Diseño experimental</i>	38
3.8. <i>Análisis estadístico</i>	38
4. RESULTADOS	
4.1. <i>Resultados de la evaluación de la Motilidad en Masa</i>	39
4.2. <i>Resultados de la evaluación de la Motilidad individual progresiva</i>	41
4.3. <i>Resultados de la tinción vital con eosina</i>	43
5. DISCUSIÓN	45
6. CONCLUSIONES	48
7. ANEXOS	
7.1 Anexo fotográfico	49
7.2 Anexo cuadros	54
8. AGRADECIMIENTOS	59
9. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: Diferencias entre semen refrigerado y congelado.....	13
Cuadro N°2: Resultados estudio Thieber y Wagner (2002).....	14
Cuadro N° 3: Composición de la membrana plasmática de diferentes especies.....	19
Cuadro N°4: Cambios en los espermatozoides en la capacitación y la criopreservación.....	20
Cuadro N° 5: Composición de distintos diluyentes.....	22
Cuadro N° 6: Efecto de distintas concentraciones de trehalosa sobre motilidad espermática, integridad acrosomal e integridad de membrana en espermatozoides bovinos descongelados.....	27
Cuadro N°7: Cuadro evaluación MM.....	36
Cuadro N° 8: Cuadro evaluación MIP.....	36
Cuadro N°9: Cuadro con medidas de resumen de MM.	40
Cuadro N°10: Cuadro con medidas de resumen de MIP.	42
Cuadro N°11: Cuadro con medidas de resumen de % vivos.....	44
Cuadro N°12: Cuadros para anotar los resultados de las mediciones.....	54
Cuadro N°13: Cuadro de chequeo de la curva de refrigeración.....	55
Cuadro N°14: Cuadros evaluación individual toros.....	56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°1: Curva de fertilidad según cantidad de espermatozoides competentes.....	17
Gráfico N°2: Gráfico de perfiles de la variación de la MM en el tiempo.....	39
Gráfico N°3: Diferencias significativas entre tratamientos y tiempos(MM)...	40
Gráfico N° 4: Gráfico de perfiles de la variación de la MIP en el tiempo....	41
Gráfico N° 5: Gráfico de MIP, diferencias significativas.....	43
Gráfico N°6: Gráfico de perfiles de la variación de la %vivos en el tiempo...44	
Gráfico N°7: Gráfico diferencias entre tratamientos (%vivos).....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Estructura química de la trehalosa.....	24
Figura N°2: a. Acción de la trehalosa en la desecación de proteínas.	
b. Acción de la trehalosa en la bicapa lipídica.....	25
Figura N°3: Esquema de la recolección de semen en la manga.....	30
Figura N° 4: Esquema del manejo de los diluyentes.....	31
Figura N°5: Gráfico que demuestra cómo realizar el pool.....	33
Figura N°6: Curva de refrigeración.....	34
Figura N°7: Esquema de los pasos desde la obtención de la muestra.....	35
Figura N°8: Dibujo con los pasos a seguir para realizar el frotis.....	37
Figura N°9: Esquema del diseño experimental del ensayo.....	38

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen N° 1: Laboratorio CAEG.....	49
Imagen N° 2: Laboratorio UCA.....	49
Imagen N° 3: Traspaso de diluyentes con pipeta electrónica (CAEG).....	50
Imagen N° 4: Pipeta electrónica (CAEG).....	50
Imagen N° 5: Baño maría a 35°C (CAEG).....	50
Imagen N° 6: Platina atemperada con diferentes tips y portas (CAEG).....	51
Imagen N° 7: Electroeyaculador y colector de semen.....	51
Imagen N° 8: Electroeyaculador ELECTROJAC IV.....	51
Imagen N° 9: Toro en el cepo.....	52
Imagen N° 10: Introducción del electroeyaculador via rectal.....	52
Imagen N° 11: Recolección de semen por Méd. Vet. Eduardo Martínez.....	52
Imagen N° 12: Recipiente de tergopol para realizar curva de refrigeración...53	
Imagen N° 13: Termómetro marcando los (5°C).....	53
Imagen N° 14: Motilidad Masal.....	53
Imagen N° 15: Tinción con eosina.....	54

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La producción animal ha crecido notablemente durante los últimos cien años debido al fuerte avance de sus pilares, que son la nutrición, la sanidad, la reproducción, la genética y el manejo. Este crecimiento se manifiesta en un mayor volumen, calidad y diversidad de los productos ganaderos, con el fin principal de alimentar a la población.

Al analizar la evolución a través del tiempo de las biotecnologías de la reproducción, se pueden diferenciar tres grandes generaciones. La primera comienza en la década del 30, con el descubrimiento de la inseminación artificial. Luego, a partir de 1970 surge el trasplante embrionario. Por último, en la actualidad se encuentran en auge el sexado de semen y embriones, la fecundación *in vitro* y la clonación (Decuadro-Hansen).

La inseminación artificial, a pesar de ser una de las biotecnologías reproductivas más antiguas del planeta, es la que presenta mayor implementación a nivel mundial (Bols et al., 2010). Esta técnica presenta importantes beneficios a nivel productivo ya que permite mejorar la genética del rodeo, utilizando semen de toros de genética superior a la del rodeo general (Roa, 2005). Además, permite al productor preñar vacas sin la necesidad de contar con toros en su rodeo o teniendo un menor porcentaje, disminuyendo notablemente costos de mantenimiento y reposición (Martínez).

La detección de celos es un factor limitante en la eficiencia reproductiva de una producción ganadera. La utilización de un programa de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) permitiría evitar la tediosa tarea de detección de celo, mejorando así los índices reproductivos del rodeo y aumentando la tasa efectiva de preñez (Cutaia y Bó).

Es posible realizar la IATF tanto con semen congelado (almacenado en estado de congelación en nitrógeno líquido a -196°C) como con semen refrigerado (conservado en estado líquido a bajas temperaturas, pudiendo ser entre $15-20^{\circ}\text{C}$ o $4-5^{\circ}\text{C}$) (Decuadro-Hansen). Utilizando semen refrigerado, los espermatozoides sufren menos ya que no se enfrentan al proceso de congelación-descongelación, por lo que la dosis inseminante con semen refrigerado presenta aproximadamente 10 veces menos de espermatozoides (Holt, 2000). La implementación de semen refrigerado en sistemas de IATF podría aumentar la eficiencia y la rentabilidad de la producción, disminuyendo notablemente el costo de preñez al utilizar menor número de espermatozoides por dosis (Martínez y López). Por ende, por eyaculado se podrían tener mayor cantidad de dosis y preñar más vacas por salto.

Otra práctica interesante que podrían poner en ruedo los productores para disminuir los costos de producción y se complementa muy bien con la IATF con semen refrigerado, es la adquisición de toros de buena genética entre grupos de productores de una determinada zona. Por más que estos toros no sean de tan elevada genética como los que se adquieren al comprar semen en Centros de Inseminación, es posible que igualmente sean mejoradores del rodeo. De esta manera sería posible disminuir en gran medida los costos de mantenimiento de los reproductores y además mejorar índices reproductivos del rodeo, preñar antes los

vientres y obtener terneros más pesados a la hora del destete. Como consecuencia, se lograrían más kilogramos de carne por hectárea, mejorando así la rentabilidad de la empresa agropecuaria.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la viabilidad in vitro del semen bovino refrigerado (5-7°C) mediante monitoreo dinámico (0, 6, 12, 24, 48 y 72hs) de parámetros microscópicos.

Objetivos particulares

- Comparar la viabilidad in vitro del semen bovino refrigerado con y sin agregado de trehalosa.
- Determinar la ventana óptima de utilización para su implementación con IATF.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importancia de la inseminación artificial en mejoramiento genético y manejo reproductivo bovino

2.1.1. La inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) es una técnica que se encuentra dentro de las tecnologías de la reproducción asistida, que consiste en la deposición de semen en el tracto reproductivo de la hembra, sin que se produzca la monta natural (Morrel, 2011). La IA ha tenido a lo largo del tiempo un enorme impacto en todo el planeta, siendo en la actualidad, la biotecnología de la reproducción más utilizada. Gracias a su gran aceptación se ha favorecido el desarrollo de nuevas tecnologías como la criopreservación, el sexado de semen, la regulación del ciclo estral, transferencia embrionaria y la clonación (Foote, 2002).

Los comienzos de la IA se remontan siglos atrás, por los años 1300 D.C., cuando los árabes realizaban inseminaciones para cruzar a sus caballos. Sin embargo, la primera inseminación artificial documentada fue en el año 1784 cuando el italiano Spallanzani realizó una inseminación con éxito en la especie canina. A partir del 1900, Rusia se interesó en esta biotecnología e Ivanow estudió esta técnica en animales de granja como equinos, bovinos, ovinos, perros, zorros, conejos y aves de corral (Foote).

Antes de la Segunda Guerra Mundial, la mayoría del ganado europeo y norteamericano se apareaba mediante servicio natural. La IA comienza a difundirse a nivel comercial en el mundo a fines de la década del 40, enfatizando su utilización mayormente debido a problemas sanitarios (enfermedades venéreas), que causaban problemas de fertilidad y bajos índices reproductivos (Verberckmoes, 2004). Más adelante, los motivos principales de su utilización

pasan a ser las mejoras de los índices de fertilidad y el progreso genético que producen sobre el rodeo (Foote, 2002).

La IA se realizaba en un comienzo con semen refrigerado o almacenado a temperatura ambiente. En la década del 50, se descubren los efectos del glicerol como crioprotector y se lo utiliza en diluyentes para congelar semen. Es así como comienza a utilizarse masivamente a nivel mundial la inseminación con semen congelado a partir de los años 60 (Verberckmoes, 2004). El gran resultado de la inseminación artificial en sus comienzos se debió a que era una técnica sencilla, económica y con gran efectividad, pero su implementación creció notablemente con la introducción de protocolos de criopreservación (Bols et al, 2010).

2.1.2. Ventajas de la inseminación artificial

Se pueden dividir en ventajas genéticas, sanitarias y económicas.

Ventajas genéticas

- Mediante la IA es posible el mejoramiento genético del rodeo de manera rápida y sencilla. Al utilizarse semen de toros cuya calidad genética ha sido comprobada mediante pruebas de progenie, se espera un mejoramiento y una mayor producción de leche y carne (Roa, 2005).
- La IA permite al productor maximizar los beneficios del vigor híbrido mediante cruzamientos utilizando cualquier número de toros o razas en el mismo grupo de manejo (Navarro).

Ventajas sanitarias

- Ayuda a la prevención de enfermedades venéreas. Al evitar el contacto directo entre la hembra y el macho se previene el contagio e introducción de ciertas enfermedades (Roa, 2005).

Ventajas económicas

- El productor puede utilizar semen de un toro sin necesidad de ser propietario del mismo, pudiendo encontrarse en otra región e incluso haberse muerto (Morrel, 2011).
- Se evita el mantenimiento y reposición de los toros, siendo beneficioso no solo económicamente sino simplificando el manejo (Martínez).
- De un solo toro se pueden obtener miles de dosis de semen al año (10.000 a 100.000 según calidad del semen y demanda) (Martínez).
- Toros de gran valor, lesionados y no aptos para la monta, pueden ser utilizados para producir semen por muchos años, de esta manera se aprovecha su valor genético (Navarro).
- La IA se complementa perfectamente con la sincronización de celos, siendo una herramienta útil para reducir los periodos de servicios y de pariciones, logrando terneros más grandes al destete y más uniformes en edad, tamaño, peso y calidad genética (Navarro).
- Posibilita efectuar un control más severo y beneficioso de la actividad sexual del rodeo, a través de mejores registros de servicios, diagnóstico y

control de la fecundidad, y por lo tanto, mejores porcentajes de parición (Bavera, 2005).

- La IA permite mediante el uso de toros con “facilidad de parto”, disminuir la incidencia de partos distócicos sin afectar el progreso genético del rodeo (Allende, 2007).
- Permite en tambos lograr vacas capaces de alcanzar una mayor producción láctea, como así también una mejor calidad de la leche (Allende, 2007).
- En rodeos de cría, la IA posibilita al productor la elección de semen de toros con características deseadas para su rodeo como ser peso al nacer, peso al destete, peso al año, entre otros (Allende, 2007).

2.1.3. Desventajas de la inseminación artificial

Es probable que la inseminación artificial no cuente con desventajas, pero es importante tener en cuenta que al implementarla hay un aumento en la complejidad de los trabajos:

- Se necesita personal de campo debidamente capacitado, sobre todo en la observación del celo y el acto de inseminar (Bavera, 2005).
- Es imprescindible conocer la sanidad y el poder fecundante del toro dador del semen (Bavera, 2005).
- La detección de celos es un factor limitante de la eficiencia reproductiva de un rodeo. Sin embargo, la misma puede ser reemplazada por un programa de IATF, llevando a simplificar el manejo y alcanzar mejores índices reproductivos (Cutaia y Bó).

2.2. Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)

2.2.1. Generalidades

En un programa de IA tradicional, se observan a los animales dos veces por día, apartando los detectados en celo para su posterior inseminación. Estos programas duran entre uno y dos meses y necesitan de por lo menos dos personas afectadas exclusivamente a este trabajo durante todo el período (Bó y Tegli, 2005). A pesar de implementarse numerosas estrategias para mejorar la eficacia en la detección de celos (detectores de monta con pintura, mayor tiempo de observación diario, podómetros, entre otros), esta tarea sigue siendo complicada y un factor limitante de los índices reproductivos (Cutaia y Bó). Esto se debe a distintos factores: por un lado, el celo dura en promedio de 15 a 18 horas, con una amplia variación entre individuos, pudiendo durar desde 2 a 3 horas hasta 24 horas; por otro lado, la mayor cantidad de celos se manifiestan durante la noche (Butler y Cesaroni, 2007). Un tercer factor podría recaer en distintas cuestiones de manejo como ser días de lluvia (en donde es probable que no se realice la observación de manera adecuada), cantidad de tiempo que se le dedica a la observación (en muchos establecimientos no se le da la importancia que esta tarea realmente tiene), personal no correctamente entrenado y la necesidad de potreros especiales cerca de la manga (Bó y Tegli, 2005). Esta sumatoria de situaciones hacen que la detección sea muy complicada, pudiendo en una población

sexualmente cíclica solo detectarse entre el 60 y 80% de los celos ocurridos (Butler y Cesaroni, 2007).

Es posible calcular la eficiencia de un programa de IA (tasa de preñez) mediante la multiplicación del porcentaje de animales que fueron detectados en celo (eficiencia de detección de celos) por el porcentaje de animales que se preñaron al inseminar (índice de concepción) (Bó y Tegli 2005). Al eliminar la variable detección de celos, la tasa de preñez resulta igual a la tasa de concepción (Cutaia, 2006).

El objetivo teórico de un sistema de producción bovina es lograr un ternero por vaca al año. Si a los 365 días del año, se le restan los 283 días que dura en promedio una gestación, se obtiene que la vaca debe preñarse a los 82 días de parida. Si además hay que tener en cuenta que la vaca luego del parto necesita un periodo de recuperación de su sistema reproductivo de entre 40 y 60 días, se obtiene solamente entre 1 y 2 celos para preñar a la vaca y llegar al objetivo deseado (Leblic, 2007).

Según Cutaia (2006), la IATF es una gran alternativa para evitar la detección de celos y disminuir el intervalo entre partos. Leblic (2007) argumenta que la IATF permite incrementar el número de vientres preñados en forma anticipada y en un periodo corto de tiempo. Butler y Cesaroni (2007), remarcan que al concentrar la parición disminuye al próximo año el intervalo parto-reinicio de servicio y se aumentan así el número de oportunidades para concebir durante la temporada de servicios.

2.2.2. Protocolos de IATF

En los últimos 25 años se han producido importantes avances que han permitido obtener protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo que logran prescindir de la detección de celos y permiten inseminar un rodeo completo en un momento determinado (Marcantonio, 2007). El desarrollo de un buen sistema de sincronización de la ovulación, se basa en la comprensión de las bases biológicas de la dinámica folicular ovárica y de la regresión del cuerpo lúteo (Cutaia y Bó). Estos modernos protocolos de IATF, logran controlar el momento determinado de ovulación e inseminar en tiempos prefijados sin detección de celo, logrando la inseminación en un periodo muy corto y con poco movimiento de hacienda (Marcantonio, 2007).

En la actualidad existen una gran cantidad de tratamientos para sincronizar vacas con cría, vaquillonas o vacas secas, tanto para ganado lechero como para carnívoros (Cutaia, 2006). Prácticamente en todos se incluye la utilización de dispositivos intravaginales bovinos (DIB) liberadores de la hormona progesterona. Éstos son introducidos en los animales durante 7-9 días (Marcantonio, 2007), logrando mantener altos niveles circulantes de esta hormona durante su permanencia en la vagina, permitiendo controlar el celo y la ovulación (Cutaia, 2006). El tratamiento se combina con la administración de estrógenos y prostaglandinas en forma intramuscular y la IATF se realiza entre 48 y 56 horas luego del retiro del dispositivo (Marcantonio, 2007). Según Marcantonio (2007), el protocolo brinda cierta flexibilidad en el tiempo de permanencia del DIB (7,8 o

9 días) pero luego de retirarlo se activa el “reloj de la ovulación” y se debe ser muy respetuoso con los tiempos. Cutaia (2006) enfatiza la importancia de inseminar a todas las vacas en un rango de 4 horas, por lo cual, es muy importante programar la cantidad de animales según las instalaciones y el personal disponible.

Luego de realizar la IATF existen diferentes alternativas a seguir. La primera opción consiste en realizar repaso con toros, el cual deberá comenzar 10 días después de la IATF para evitar confusiones de preñeces. Otra alternativa, es realizar una resincronización de celos, reinseminando a los animales vacíos en un rango que va desde los 20 a 25 días post IATF (Cutaia, 2006). Por último, una tercera opción es realizar detección de celos e inseminación durante 7 días seguidos, comenzando a detectar celo luego de dos semanas de realizada la IATF (Martínez).

2.2.3. Resultados IATF

Los resultados de IATF son positivos y hay pequeñas diferencias entre distintos autores. Según Brogliatti (2006), se puede obtener un 50-60% de preñez. Para Cutaia (2006), la mayoría de los tratamientos actuales son eficientes, y se pueden alcanzar aproximadamente el 50% de preñez en rodeos carniceros y 40-45% en rodeos lecheros. Para Marcantonio (2007), los porcentajes de preñez varían entre un 40-55% según el nivel de ciclicidad de los animales utilizados y según su condición corporal. Según Martínez y López, los porcentajes de preñez por servicio rondan el 50% y mediante resincronización de celos es posible preñar al 75% de los individuos con 2 dosis de semen por preñez. Para Cutaia (2006), se pueden esperar resultados de 70-75% de preñez con dos inseminaciones en rodeos carniceros y un 60-70% para ganado lechero. Mientras que Butler y Cesaroni (2007), establecen que mediante una resincronización se puede obtener una tasa de preñez de entre el 60-70%.

2.2.4. Ventajas de su implementación

Son numerosos los motivos para incorporar un programa de IATF en un establecimiento, entre ellos se pueden nombrar:

- Simplifica la adopción de la técnica de IA en rodeos que no la emplean, permitiendo a establecimientos con poco apotramiento, con monte, sin inseminador o sin equipo propio, realizar IA que de otra manera hubiera sido prácticamente imposible implementar (Marcantonio, 2007). En estos casos, los establecimientos incorporan los múltiples beneficios que la IA otorga.
- Permite evitar o disminuir la detección de celos, llevando así a un aumento en la eficiencia reproductiva global del establecimiento (Cutaia, 2007).
- Permite incrementar la cantidad de vacas inseminadas en establecimientos que sí utilizan IA. Aproximadamente el 90% de las IA que se realizan en rodeos de cría se hacen sobre vaquillonas. Utilizando IATF se simplifica la IA en vacas con cría y se aumenta la cantidad de hembras posibles de inseminar (Marcantonio, 2007). Tradicionalmente, las vacas con cría no se incluyen en programas de IA por la gran proporción de vacas en anestro

(sin manifestar celo) y por la complejidad para realizar tareas de detección de celos en rodeos de hembras con ternero al pie (Cutaia, 2006). Según Butler y Cesaroni (2007), esta categoría es la de mayor proporción en el rodeo (70-80%), y al ya haber parido no tiene como limitante el peso del ternero al nacer, por lo que se puede incorporar reproductores sin esa condicionante. En conclusión, es un gran beneficio incorporar esta categoría en el rodeo a inseminar.

- Se obtiene una mayor cantidad de kilos de ternero destetado, debido a una mayor cabeza de preñez y a una menor dispersión del promedio de edad de destete. Es posible apreciar en promedio un peso del 18% mayor al servicio convencional (Butler y Cesaroni, 2007). Según Marcantonio (2007), el aumento en kilogramos ronda entre un 18 y 20%, siendo esta diferencia atribuida parte a la superioridad genética del toro inseminante y parte a que los terneros nacen antes.
- Permite una mejor y mayor atención al parto, ya que se acorta el periodo de parición (Marcantonio, 2007).
- Posibilita un mejor aprovechamiento de los recursos forrajeros (Marcantonio, 2007).
- Facilita la implementación de destete precoz, al tener lotes de terneros más homogéneos por ser de similar edad y peso (Marcantonio, 2007).
- Disminución del intervalo entre partos (Cutaia, 2007).

2.2.5. Desventajas

Son pocas y son ampliamente superadas por los beneficios. Entre ellas encontramos:

- El costo de las drogas para sincronización de celos (Brogliatti, 2006).
- Se necesita la contratación de profesionales para realizar la IATF (Brogliatti, 2006).
- La necesidad de 3 o 4 tratamientos y pasada de los animales por manga (Brogliatti, 2006).
- En general son esquemas rígidos, y en caso de alguna complicación, como ser climática, debe realizarse la inseminación en el momento determinado por el protocolo (Brogliatti, 2006).

2.3. Conservación de semen bovino y su utilización en combinación con IATF

2.3.1. Temperaturas de conservación del semen

Según Decuadro-Hansen, las técnicas de conservación de semen más utilizadas en el mundo son dos:

- Conservación en estado refrigerado (en estado líquido, fresco): su conservación puede ser entre 15-20°C o entre 4-5°C. Mediante la conservación a 5°C, se disminuye la actividad metabólica de los espermatozoides y se produce una reducción en el crecimiento bacteriano, llevando al eyaculado a extender su supervivencia (Vishwanath y Shannon, 2000). Es posible la implementación de semen refrigerado a 5°C

en un programa de IATF, ya que se estima una vida útil de entre 2 y 4 días, facilitando su transporte e implementación (Vishwanath y Shannon, 2000). Según Lemma (2011) el semen almacenado entre 5-8°C sobrevive entre 24-48 horas sin una disminución significativa en la motilidad y hasta 96 horas sin un marcado descenso en el porcentaje de fertilidad.

- Conservación en estado congelado en nitrógeno líquido: a -196°C. Según Stornelli et al. (2005), mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil, preservando el semen por años.

2.3.2. Ventajas y desventajas de los métodos de conservación

A continuación se expone el cuadro número 1, que contiene las ventajas y desventajas de ambos métodos de conservación de semen.

		Tipo de conservación	
		Refrigerado	Congelado
Ventajas	Bajo número de espermatozoides	Almacenamiento por largos periodos	Momento de uso flexible
	Almacenamiento a bajo precio		
	Fácil de implementar a campo		
	Mayor cantidad de dosis		
Desventajas	Vida útil limitada	Alto número de espermatozoides	
		Menor cantidad de dosis	
		Mayor precio de almacenamiento	

Cuadro N° 1: Diferencias entre semen refrigerado y congelado. Fuente: Vishwanath y Shannon, 2000.

La mayor ventaja del semen refrigerado, motivo por el cual esta tecnología se encuentra en utilización cada vez en más países, es el bajo número de espermatozoides utilizados por dosis inseminante. Por otro lado, su principal desventaja es su vida útil limitada, con la imposibilidad de almacenar las muestras por largos periodos (Vishwanath y Shannon, 2000).

Contrariamente, el semen congelado permite el almacenamiento de las muestras por largos periodos, permitiendo una mayor flexibilidad en cuanto al transporte y utilización del semen. Su principal desventaja es la principal virtud del semen refrigerado, el semen criopreservado necesita una gran cantidad de espermatozoides por dosis inseminante para obtener resultados similares a los obtenidos con semen refrigerado (Vishwanath y Shannon, 2000).

Otra desventaja del semen criopreservado no mencionada anteriormente es que existe una gran diferencia de sensibilidad a los procesos de congelación entre los espermatozoides de distintos machos (Stornelli et al., 2005). Según Decuadro-Hansen, el éxito de la inseminación se encuentra en gran medida por el toro utilizado dado que existe una gran variabilidad en la calidad de congelación entre individuos. Esto lleva muchas veces a que los centros de IA seleccionen a favor de genotipos resistentes a la congelación en vez de realizar la selección en base a

características netamente productivas. Según Vishwanath y Shannon (2000), con semen líquido los toros responden de manera similar a dosis sub-óptimas, mientras que hay una gran variación en semen congelado, llevando a utilizar dosis con mayor cantidad de espermatozoides a los necesarios ante la posibilidad que el toro responda de mala manera a la congelación.

2.3.3. Utilización de semen refrigerado y congelado en el mundo

Desde aproximadamente 1960, se dejó de utilizar semen refrigerado para inseminar, siendo desde entonces, el semen congelado el más utilizado a nivel mundial. En los últimos años, una serie de países como Nueva Zelanda, Francia, Holanda e Irlanda comenzaron a utilizar semen refrigerado nuevamente para incrementar la productividad de toros de buena genética (Decuadro-Hansen). En el año 1995 fue llevado a cabo por Chupin y Thieber un censo a nivel mundial, que reveló que en todo el mundo se realizaban poco más de 200 millones de inseminaciones. De la totalidad de las inseminaciones realizadas, el 95% se realizaban con semen congelado, y solamente unos 4 millones con semen refrigerado (Vishwanath y Shannon, 2000). Luego, Thieber y Wagner (2002), relevaron que en el año 2002 se realizaron unos 260 millones de inseminaciones, siendo al igual que en el otro estudio, el 95% correspondiente a semen criopreservado (Bols et al. 2010). A continuación, se expone el cuadro número 2 con los resultados del estudio realizado por Thieber y Wagner (2002), sobre la cantidad de dosis utilizadas a nivel mundial de semen refrigerado y congelado, según región geográfica.

REGIÓN	N° DOSIS(X1000)		TOTAL	
	Refrigerado	Congelado	X 1000	%
África	55	1484	1540	0,6
Norteamérica	0	43270	43270	16,40
Sudamérica	0	5917	5917	2,2
Oceanía	8875	69938	78813	27,5
Asia	31	2559	2590	1
Europa	2694	135563	138257	52,3
TOTAL	11655	252733	264388	100

Cuadro N°2: Resultados Thieber y Wagner (2002), “World statistics for artificial insemination in cattle”. Fuente: Bols et al, 2010.

Según Curson et al. (1991) y Vishwanath et al. (1996), en Nueva Zelanda se realizan unas 2,5 millones de inseminaciones en un periodo de entre 16-20 semanas durante primavera y verano. Más del 85% de dichas inseminaciones se realizan con semen líquido refrigerado, con una vida media de 4 días (Vishwanath y Shannon, 2000).

2.3.4. IATF con semen refrigerado y congelado

Diversos autores (Brogliatti; Decuadro-Hansen; Martínez y López; Torquati et al.; Schuh) demuestran que es posible obtener resultados similares de preñez tanto con semen congelado como con semen refrigerado. Otros

investigadores creen que no solo es posible alcanzar tales logros, sino que la fertilidad del semen congelado es inferior a la del semen almacenado en estado refrigerado (Stornelli et al. 2005; Watson, 2000).

Según Brogliatti, el uso de semen refrigerado en sistemas de IATF podría disminuir el costo de la preñez lograda debido a una mayor eficiencia (menor cantidad de espermatozoides por dosis) y también, aumentar la tasa de concepción debido a un mayor tiempo de vida útil del semen en el oviducto por no haber sufrido la agresión del proceso de congelado. En su ensayo concluyó que la utilización de semen refrigerado puede ser una buena alternativa ya que al utilizar la mitad de la dosis de semen logró alcanzar un 10% más de preñez.

Decuadro-Hansen analiza dos ensayos. Uno realizado por Gerard et al. en donde los resultados dieron ligeramente inferiores al utilizar semen refrigerado en contraposición al congelado. El autor argumenta que el valor inferior se debe a que en el ensayo se utilizó un promedio de 3 días de inseminación con semen refrigerado, mientras que si se hubiese realizado con semen refrigerado del primer día el resultado posiblemente hubiera sido a favor del semen refrigerado. Otro estudio fue realizado por Bucher et al. en 2009 y se llegó a la conclusión de que no hubo diferencias de preñeces entre semen refrigerado y congelado, incluso con un número de espermatozoides 85% menor para el semen refrigerado. Decuadro-Hansen argumenta que la ventaja de conservar semen en estado refrigerado y realizar IATF puede deberse a la viabilidad de los espermatozoides en el tracto genital bovino, sumado al beneficio de no requerir el proceso de congelación-descongelación, que muchas veces va de la mano de errores humanos.

En el ensayo realizado por Martínez y López no hubo diferencias significativas entre los índices de preñez con semen congelado y refrigerado, aunque si se encontró una pequeña diferencia a favor del último. El autor intuye que si la población en estudio hubiera sido mayor, posiblemente se hubieran obtenido diferencias significativas a favor del semen refrigerado.

Otro experimento con resultados similares fue el realizado por Torquati, Zalazar, Cabodevila y Callejas, en el cual se llega a la conclusión que el método de conservación del semen no afecta el porcentaje de preñez al realizar IATF en vacas con ternero al pie, sincronizadas con dispositivo intravaginal con progesterona.

También Schuh concluyó que utilizando semen refrigerado en los primeros dos días de su procesamiento no se observan diferencias significativas con respecto al semen congelado.

Stornelli et al. (2005) establece que la fertilidad del semen criopreservado es inferior a la del semen refrigerado debido a que hay daños subletales en la población espermática que sobrevive al proceso de congelación. Un punto de vista similar tiene Watson (2000), que establece que comparando el semen congelado con el refrigerado se observa una menor fertilidad, siendo esta disminución debida a una menor viabilidad de los espermatozoides luego del proceso de descongelación, sumado a una disfunción subletal en un porcentaje de los espermatozoides sobrevivientes. Según el autor, esta diferencia de menor

fertilidad se compensa mediante la utilización de un mayor número de espermatozoides en la dosis inseminante. Para Stornelli et al. (2005), la pérdida espermática ocurrida durante la congelación-descongelación también se compensa mediante la inseminación de un elevado número de espermatozoides o mediante la colocación de semen en la porción craneal del tracto reproductivo.

Waberski et al. (1994), notificó que el semen criopreservado tiene altos resultados si la inseminación se realiza hasta 4 horas antes de la ovulación. Si no se realiza en esos términos la fertilidad decae de manera importante, mientras que el semen refrigerado presenta una mayor fertilidad ya que perdura por mayor tiempo en el tracto femenino (Watson, 2000). Para Bailey et al. (2000), el semen congelado presenta daños que producen un pobre transporte y supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino.

2.3.5. Cantidad de espermatozoides necesarios para inseminar

Es notable la menor cantidad de espermatozoides que se necesitan para lograr una preñez con semen refrigerado con respecto a semen congelado. Según Shannon (1978), debido al nivel de espermatozoides con daños subletales el número de espermatozoides necesarios para comparar fertilidad entre semen refrigerado y congelado bovino es de 10 a 1, es decir, se necesitan 10 veces más de espermatozoides con semen congelado para lograr fertilidades similares (Holt, 2000).

Según Decuadro-Hansen (2011), con semen congelado se utilizan entre 10 y 30 millones de espermatozoides, mientras que en el semen refrigerado se puede inseminar solamente con entre 1,5 y 5 millones. Foote, argumenta que en Nueva Zelanda se insemina con aproximadamente 2 millones de espermatozoides, y la fertilidad baja si se disminuye ese número en gran cantidad. El menor número de espermatozoides necesarios para tener una alta fertilidad dependerá de la calidad del semen, del diluyente utilizado, la habilidad del inseminador y de la condición de la vaca a inseminar.

Según Vishwanath y Shannon (2000), con un eyaculado promedio de 5 ml que contiene 1,5 billones de espermatozoides por mililitro se podrán obtener entre 350 y 500 pajuelas para semen congelado con dosis de entre 15 a 20 millones de espermatozoides cada una. Mientras que con el mismo eyaculado, utilizando semen refrigerado se pueden obtener 7500 dosis inseminantes con 1 millón de espermatozoides cada una o 3750 con una mayor concentración de espermatozoides (2 millones). Claramente, se observa que el costo de la dosis de semen refrigerado será muy bajo al compararlo con el semen criopreservado. Utilizando semen refrigerado con baja dosis de espermatozoides (2,5 millones) en vez de semen congelado con 20-25 millones puede permitir pasar de unas 40.000 inseminaciones al año a más de 100.000 inseminaciones, facilitando una mayor penetración de las características favorables de un individuo (Schuh).

Watson (2000) argumenta que cuando la cantidad y la calidad de los espermatozoides en la dosis inseminante es baja, la fertilidad se ve reducida siguiendo una curva exponencial. En el siguiente gráfico se aprecia la curva de fertilidad.

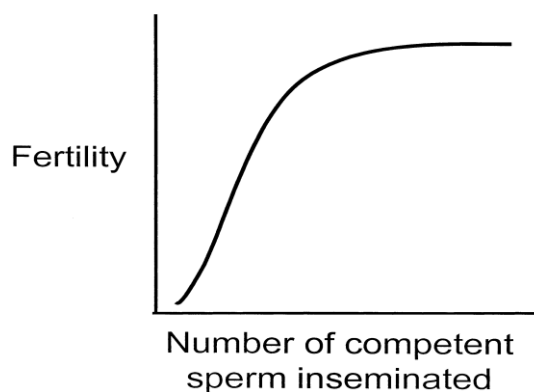


Gráfico N°1: Curva de fertilidad según cantidad de espermatozoides competentes.
Fuente: Watson, 2000.

Si se insemina con suficiente cantidad de espermatozoides competentes se alcanzará la fertilidad de la asíntota de la curva. La fertilidad del semen puede variar según el individuo y puede verse influenciada por el procedimiento de criopreservación (Watson 2000). Con semen congelado se necesita una mayor cantidad de espermatozoides ya que al haber daños en el proceso de congelación-descongelación el número de espermatozoides competentes es menor si se lo compara con una dosis de igual cantidad de espermatozoides de semen refrigerado.

2.3.6. Características del proceso de refrigeración y congelación. Efectos sobre las células espermáticas

En el proceso de congelación-descongelación del material seminal se observan una serie de cambios importantes que producen una alteración en la capacidad fecundante de los espermatozoides. Estas variaciones se manifiestan a nivel bioquímico y anatómico de los espermatozoides en lugares como el acrosoma, el núcleo, el axonema, la membrana plasmática, las mitocondrias, entre otros, y se deben al estrés mecánico que sufren los espermatozoides al exponerse a cristales de hielo y a la hiperosmolaridad del medio extracelular (Decuadro-Hansen).

En el protocolo de criopreservación se pueden encontrar una serie de potenciales causantes de daño por estrés, entre los cuales se encuentran: los cambios de temperatura; daño osmótico por la concentración de sales en el medio debido al agregado de crioprotectores; la formación y disolución de cristales de hielo en el medio extracelular (Watson, 2000). Sumado a estos daños, se le agregan el efecto tóxico del glicerol y la respuesta inmune inducida en algunos animales frente a la presencia de la yema de huevo del diluyente (Decuadro-Hansen). Dichos factores que ocurren durante el proceso de congelación, son responsables de la disminución de la fertilidad en el semen congelado en comparación con el semen refrigerado, debido a la muerte de células (que no soportan el proceso de congelación-descongelación) y a la disfunción no letal instaurada en una parte de la población sobreviviente (Stornelli et al., 2005).

Según Watson (2000), en la criopreservación se producen los mayores daños al pasar de temperaturas entre 0 y -80°C, en donde sobreviven solamente

entre el 50 y 60% de los espermatozoides totales. Para Stornelli et al. (2005), se pierde el 50% de la población inicial de los espermatozoides debido a los efectos de la criopreservación sobre las membranas, el citoesqueleto, el aparato motor y el núcleo del espermatozoide.

En los espermatozoides se encuentran dos estructuras que sufren notablemente el proceso de congelación-descongelación, y son: la membrana plasmática y el ADN (Decuadro-Hansen). La membrana plasmática sufre una serie de cambios químicos, topográficos y mecánicos a nivel de los lípidos, que la llevan a su degradación, a través de la pérdida de su integridad y su peroxidación, contribuyendo al proceso denominado apoptosis que genera problemas de motilidad, inducción a la reacción acrosómica o problemas de fecundación (Watson, 2000). Con respecto al ADN y su susceptibilidad a la congelación, es de vital valor la integridad del mismo para la obtención de embriones viables al realizar la inseminación (Watson, 2000).

Generalmente, tanto para conservar semen en estado refrigerado o congelado, se pasa de temperaturas cercanas a la temperatura corporal del animal (30-39°C) a 5°C. Luego, para el caso de la criopreservación se continúa descendiendo la temperatura hasta -196°C. Para la mayoría de las especies domésticas, este cambio de temperatura representa un estrés importante para la membrana plasmática de los espermatozoides, resultando en la reorganización y desestabilización de los componentes de membrana y afluencia de calcio (Bailey et al., 2003).

El enfriamiento rápido del eyaculado desde 30°C a 0°C induce a un estrés letal en cierta proporción de células espermáticas, siendo proporcional a la velocidad de enfriamiento y al intervalo de temperaturas. Este fenómeno es conocido como shock de frío, y es importante que la disminución de la temperatura entre ese rango se haga de manera lenta y cuidadosa para disminuir la cantidad de espermatozoides dañados (Watson, 2000).

A pesar de que el descenso de la temperatura se haga lentamente para evitar el shock de frío, el cambio de temperatura produce estrés en las membranas, debido al cambio de fase en los lípidos presentes en las mismas. Los lípidos de las membranas pasan de estado líquido a gel, siendo la temperatura de cambio de fase específica para cada una de las familias de lípidos (Almenar, 2007). Dicho cambio de fase continúa por debajo de 0°C dado que los cambios de fase no se han completado. Según Drobnis et al. (1993), la mayor cantidad de cambio de estados se producen entre los 15 y 5°C (Watson, 2000).

Para Bailey et al. (2000) el daño que se produce en el espermatozoide durante el descenso de temperatura depende de la estabilidad estructural de la membrana plasmática. Holt (2000), establece que hay una relación de dependencia entre la composición fosfolípídica de la membrana plasmática y la relación colesterol/fosfolípidos de la misma con la sensibilidad al shock de frío, siendo las especies con mayor relación colesterol/fosfolípidos (como humanos y conejos) mayor resistentes al frío en comparación con especies con menor relación (como bovinos, ovinos, porcinos y equinos). Lo ideal es una relación elevada colesterol/fosfolípidos y una baja relación ácidos grasos

polinsaturados/saturados, porque el colesterol estabiliza las membranas disminuyendo la temperatura a la cual se produce el cambio de fase de los lípidos y porque a mayor proporción de ácidos grasos insaturados hay una mayor susceptibilidad a la peroxidación (Almenar, 2007). En la tabla expuesta a continuación se muestra la composición de las membranas de distintas especies que hacen que tengan mayor o menor susceptibilidad al choque térmico.

Especie	Relación	
	colesterol/fosfolípidos	poliinsaturados/saturado
Cerdo	0,26	2,5
Caballo	0,36	-
Morueco	0,38	2,5
Toro	0,45	3,5
Caprino	0,59	-
Conejo	0,88	0,8
Hombre	0,99	1

Cuadro Nº 3: Composición de la membrana plasmática de diferentes especies.

Fuente: Darin-Bennett y White, 1977; Rana *et al.*, 1991; Parks y Lynch, 1992 (Almenar 2007).

Watson (2000), enfatiza que es importante no olvidar los otros elementos de la membrana que pueden ser alterados por estrés térmico. Las proteínas integrales de membrana pueden alterar su función, especialmente aquellas proteínas con funciones estructurales como las proteínas de canal iónico. Según Robertson y Watson (1986) es sabido que la permeabilidad de la membrana aumenta luego del descenso de la temperatura. Para Amann (1999) se forman huecos que dan lugar a desequilibrio iónico (Almenar, 2007). Esto afecta a la regulación de calcio de la célula, teniendo graves consecuencias en su funcionamiento, pudiendo ser en casos severos incompatible con la viabilidad celular (Watson 2000).

El almacenamiento de semen refrigerado a 5°C presenta cambios que no son beneficiosos para los espermatozoides. Entre ellos se puede mencionar que se ve reducida la actividad de la bomba Na/K presentes en las membranas, imposibilitando la difusión de iones a través de la membrana celular (Vishwanath y Shannon 2000).

Según Watson (2000) hay gran similitudes entre los daños que se producen en las membranas con el descenso de la temperatura y la reacción acrosómica. Crister (1987), observó que luego de la descongelación del semen, los espermatozoides móviles con membranas intactas, no mantenían la viabilidad y su capacidad fecundante por el mismo tiempo que los espermatozoides del semen refrigerado, y concluyó que esto se debe a los cambios que se producían durante la congelación del semen, semejantes a los ocurridos durante la capacitación espermática (Stornelli *et al.*, 2005). Según Stornelli *et al.* (2005) las células espermáticas deben estar vivas, móviles y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas y funcionales, para producir la preñez.

La capacitación espermática puede definirse como la serie de eventos que permiten al espermatozoide unirse al ovocito luego de producirse la reacción acrosómica en respuesta de glicoproteínas específicas de la zona pelúcida.

Durante esta reacción se produce una afluencia de calcio provocando exocitosis del acrosoma y liberación de enzimas. La reacción acrosómica es fundamental para la fecundación ya que dichas enzimas permiten al espermatozoide penetrar al ovocito (Bailey et al., 2003).

Existen acontecimientos similares durante el enfriamiento y la reacción acrosómica, siendo los cambios ocurridos durante el enfriamiento una versión desorganizada de la reacción acrosómica (Stornelli et al., 2005; Watson, 2000; Bailey et al., 2003). Para Bailey et al. (2000), debido a las similitudes que se encuentran entre los procesos de congelación y la capacitación, es posible hablar de los cambios sufridos durante el descenso de temperatura como criocapacitación.

A continuación se enumeran los cambios ocurridos durante el proceso de capacitación espermática, según Bailey et al. (2003):

- Comienza en la membrana plasmática (Visconti et al. 1998), donde se remueve el colesterol.
- Se altera la organización lipídica-proteica (Langlais y Roberts 1985; Lin y Kan 1996).
- Aumenta la fluidez de la membrana (Wolf et al. 1986; Smith et al. 1998).
- Se produce la hiperpolarización de la membrana (Zeng et al. 1995).
- Aumenta el calcio intracelular (Parrish et al. 1999; Dubé y et al. 2001).
- Hay un aumento cíclico de adenosina 5 monofosfato (Parrish et al. 1994; Lefievre et al. 2000).
- Se produce la activación de la quinasa (Tardif et al. 2001).
- Hay fosforilación de la tirosina de las proteínas (Visconti et al. 1995; Leclerc et al. 1996; Galantino-Homer et al. 1997; Tardif et al. 1999),
- Se genera la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (de Lamarinde y Gagnon 1993).

El próximo cuadro expone los cambios ocurridos en los espermatozoides en los procesos de capacitación y criopreservación, mostrando una gran similitud entre los eventos ocurridos.

Capacitación	Criopreservación
Flourescencia CTC patrón B	Flourescencia CTC patrón B
Reorganización y fluidificación de la M.P.	Reorganización y desestabilización de la M.P.
Aumento del calcio intracelular	Aumento del calcio intracelular
Generación de ROS	Generación de ROS
Fosforilación de la tirosina mediada por cAMP	Fosforilación de la tirosina
Espermatozoide capaz de fertilizar el ovocito	Espermatozoide capaz de fertilizar el ovocito

CTC=Clorotetraciclina, patrón B quiere decir que en la fluorescencia se observó "capacitado"; M.P.=Membrana plasmática;

ROS=especies reactivas de oxígeno; cAMP=Adenocina monofosfato cíclica.

Cuadro N°4: Cambios en los espermatozoides en la capacitación y la criopreservación. Fuente: Bailey et al. (2000).

2.4. Diluyentes utilizados para la conservación de semen

2.4.1. Características que debe reunir un diluyente

Según Carballo Guerrero (2005), un diluyente para conservación de semen debe reunir una serie de propiedades básicas como:

- Ser isotónicos al semen, es decir, tener la misma concentración de iones libres para mantener la osmolaridad del medio.
- Contar con capacidad amortiguadora para evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides.
- Proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el choque térmico.
- Proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides.
- Controlar el crecimiento bacteriano.
- Deben preservar la vida de los espermatozoides sin modificar la fertilidad.
- No deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso (Muiño-Otero).

Para Salisbury (1982) un buen diluyente, además de cumplir con los puntos antes mencionados debe ser de preparación fácil, estable y económico (Carballo Guerrero, 2005). Según Watson (2000), ningún diluyente cumple con todas estas características, y además, cada especie requiere condiciones específicas.

2.4.2. Composición del diluyente

Los componentes básicos de los diluyentes utilizados para el congelamiento de semen son esencialmente los mismos que los que se utilizan para almacenar semen en estado líquido (Vishwanath y Shannon, 2000). Según Muiño-Otero los diluyentes utilizados para criopreservación de semen en la mayoría de las especies domésticas, se encuentran compuestos por las siguientes sustancias:

- Agua bidestilada o ultrapura, como disolvente del resto de los componentes.
- Sustancias iónicas y no iónicas para mantener la osmolaridad y el pH del medio.
- Materiales orgánicos como yema de huevo o leche, que cuentan con capacidad de disminuir o evitar el efecto frente al shock de frío.
- Crioprotectores, siendo el más utilizado el glicerol.
- Azúcares. Simples como fuente energética, o di y trisacáridos como crioprotectores adicionales.
- Antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano.
- Otros aditivos, que pueden ser opcionales, como enzimas, detergentes o aminoácidos que pueden mejorar la fertilidad.

2.4.3. Composición de diluyentes para almacenamiento a 5°C y temperatura ambiente.

A continuación se expone un cuadro con distintos diluyentes utilizados para la conservación de semen refrigerado a 5°C y temperatura ambiente. El

cuadro contiene a los creadores de los diluyentes con sus respectivos años y los componentes de los diluyentes, expresados en gramos cada 100 ml de medio.

Ingredientes	Yema de huevo-fosfato (Phillips, 1939)	Yema de huevo-citrato (Salisbury et al, 1941)	Diluyente IVT original (Van Demark et al, 1957)	CUE (Foote et al, 1957)	Medio Tris (Foote, 1970)	CAPROGEN (Shannon, 1965)
T° almacenamiento	5°C	5°C	5°C	5°C y ambiente	5°C y ambiente	Ambiente
Tris	-	-	-	-	3,028	-
Fosfato ácido de potasio	0,2	-	-	-	-	-
Fosfato ácido de sodio	2	-	-	-	-	-
Citrato de sodio	-	3,6	2	1,45	-	2
Bicarbonato de sodio	-	-	0,21	0,21	-	-
Cloruro de potasio	-	-	0,04	0,04	-	-
Glucosa	-	-	0,3	0,3	1,25	0,3
Acido cítrico	-	-	-	0,087	1,675	1
Glicina	-	-	-	20	-	0,014
Glicerol	-	-	-	-	8	1,25
Catalasa	-	-	-	-	-	0,003
Acido caproico	-	-	-	-	-	0,025
Yema de huevo (%)	50	50	10	20	25	5
Antibióticos	-	-	si	si	si	si
Gas	-	-	CO ₂	carbono	-	N ₂

Cuadro N° 5: Composición de distintos diluyentes. Fuente: (Vishwanath y Shannon, 2000).

2.4.4. Sustancias para mantener el pH y la capacidad tampón

Según Muiño-Otero, numerosas soluciones tamponadas se utilizan para la preservación de semen de toro, siendo mayormente mezclas de yema de huevo con tampón fosfato o citrato sódico y ajustadas a pH 6,9 por adición de ácido cítrico (Watson, 1979). Foote (1972) promovió la incorporación de Tris (tris hidroximetil aminometano) a los diluyentes utilizados para preservar semen bovino, ya que notó que al combinar dicha sustancia con yema de huevo y glicerol se favorecía notablemente la preservación de los espermatozoides a distintas temperaturas, tanto a 5°C como a -85°C. En la actualidad, la mayoría de los diluyentes utilizados para la criopreservación de material seminal contienen Tris y ácido cítrico como principales sustancias tampón (Muiño-Otero; Vishwanath y Shannon, 2000).

2.4.5. Crioprotectores

Es muy importante el efecto que generan las sustancias crioprotectoras ya que van a minimizar los daños que se producen durante el enfriamiento y la congelación-descongelación (Almenar, 2007). Existe una gran cantidad de compuestos que ejercen acción crioprotectoras sobre las células espermáticas, dividiéndose en agentes penetrantes o no penetrantes, según su acción sea intra o extracelular (Muiño-Otero). Los crioprotectores no permeables, son aquellos como azúcares, proteínas y lipoproteínas que se adicionan mediante el uso de productos naturales como la yema de huevo y la leche. No atraviesan la membrana plasmática y se ubican en el espacio extracelular, modificando la membrana o disminuyendo la temperatura de congelación del medio (Almenar, 2007).

Por el contrario, según Purdy (2005), los crioprotectores permanentes producen una reorganización de los lípidos y proteínas de membrana, aumentando la fluidez y permitiendo el paso de agua, y la deshidratación celular. Dicha deshidratación se produce mediante mecanismos de difusión simple desde el medio intracelular al extracelular por diferencias de presión osmótica. Por ende, la deshidratación de los espermatozoides lleva a una disminución en la formación de hielo intracelular (Almenar, 2007). Son crioprotectores permanentes sustancias como el glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2 propanodiol, butanodiol, acetamida y DMSO (Holt, 2000). A lo largo del tiempo, se ha demostrado que el glicerol ha dado los mejores resultados, por lo que se lo considera como el crioprotector universal, y se lo utiliza en la mayoría de las especies domésticas (Muiño-Otero). Se lo utiliza en concentraciones entre el 3 y 9% ya que mayores puede resultar nocivo, causando fundamentalmente daños osmóticos en los espermatozoides (Almenar, 2007).

2.4.6. Sustancias orgánicas protectoras contra el shock de frío

Phillips (1939) descubrió la importancia de incorporar yema de huevo en los diluyentes, al observar el mantenimiento de fertilidad de los espermatozoides (Vishwanath y Shannon, 2000), y a partir de entonces, se la incluyó en gran cantidad de diluyentes (Muiño-Otero). Lardy y Phillips (1939), hallaron que la yema de huevo preserva la motilidad espermática durante la refrigeración del semen, mientras que Jones y Martin (1973) demostraron que tiene un efecto protector de las membranas plasmáticas, acrosomal y mitocondrial de los espermatozoides expuestos a bajas temperaturas (Muiño-Otero).

Se cree que los componentes de la yema de huevo con capacidad crioprotectora son los fosfolípidos y las proteínas, sabiendo que la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDF) es la mayor responsable del efecto (Watson, 1976; Foulkes 1977). Según Foulkes (1977), la yema de huevo preserva la integridad de la membrana plasmática ya que evita la pérdida de la hialuronidasa soluble. Watson propuso que las proteínas de la fracción lipoproteica se acoplan a la superficie de membrana evitando la pérdida de fosfolípidos de membrana durante el descenso de temperatura (Muiño-Otero). Manjunath et al. (2002) hallaron que las LDF se unen de manera rápida, específica y estable con las proteínas del plasma seminal, las cuales, durante la eyaculación se unen a las

membranas espermáticas recubriéndolas e induciendo a la salida de fosfolípidos y colesterol de las membranas provocando su desestabilización. A mayor cantidad de exposición a las proteínas de plasma seminal, mayor cantidad de colesterol y fosfolípidos se remueven de la membrana y menor será su resistencia al shock de frío (Muiño-Otero). Para Shannon y Curson (1976) las lipoproteínas del huevo ayudan a los espermatozoides durante el enfriamiento y congelación ya que se unen a las proteínas del plasma seminal e impiden su efecto negativo (Shannon, 1978).

Además de la yema de huevo, se utilizan diluyentes en base a leche, ya sea leche desnatada en polvo o leche entera heterogenizada. En la leche, el agente que protege a las membranas de los espermatozoides es la caseína, cuya concentración óptima oscila entre 1 y el 8% (Muiño-Otero).

2.4.7. Adición de azúcares como crioprotectores

Según Watson (1990) los agentes no penetrantes actúan osmóticamente promoviendo la deshidratación celular durante el descenso de la temperatura, impidiendo la formación de grandes cristales de hielo en el interior de las células. Nagase et al. (1968) argumentan que estos agentes no atenúan el efecto de la alta concentración intracelular de solutos, y por tanto son más efectivos en congelaciones rápidas (Muiño-Otero).

Varios azúcares son utilizados como crioprotectores de semen bovino, y dependerá el grado de protección que brinde según el peso molecular del azúcar, la tasa de congelación y la presencia de otros criopreservantes (Unal et al., 1978).

Dentro de los azúcares más utilizados para la congelación de semen de especies domesticas se pueden nombrar: la lactosa, la sacarosa, la rafinosa y la trehalosa (Sandoval et al. 2007).

2.4.8. Trehalosa. Características generales

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido; $C_{12}H_{22}O_{11}$; PM= 342,31) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa (Mascorro Gallardo et al., 2005). En la figura número 1 es posible observar la estructura química de la trehalosa.

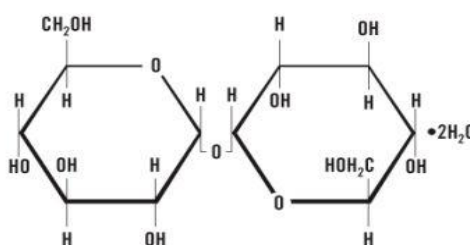


Figura N°1: Estructura química de la trehalosa. Fuente: www.cargil.com

Se conoce que este azúcar se encuentra presente en numerosos organismos como bacterias, algas, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y plantas

(Iordachescu e Imai). Estos organismos, tienen en común la propiedad de sobrevivir en estado de casi total desecación, pudiendo soportar condiciones extremas de altas o bajas temperaturas, salinidad, radiación y luego recuperar las funciones vitales al re-hidratarse (Mascorro Gallardo et al., 2005).

Las propiedades fisicoquímicas de este azúcar, explican por sí solas las amplias posibilidades de aplicación biotecnológica de la trehalosa. Se ha demostrado que es capaz de proteger y estabilizar la estructura y la función de las enzimas y la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación, y radiación (Mascorro-Gallardo et al., 2005). Según Schiraldi et al. (2002), la gran estabilidad de la trehalosa a condiciones extremas se debe a que el enlace glicosídico posee una energía de $4,184 \text{ KJ}\cdot\text{M}^{-1}$ mientras que la sacarosa presenta un enlace con solo $113 \text{ KJ}\cdot\text{M}^{-1}$ (Mascorro Gallardo et al., 2005).

La trehalosa posibilita que las proteínas, ante condiciones de estrés, mantengan mejor su actividad biológica. Esto se debe a que la trehalosa reemplaza el agua que se encuentra alrededor de las proteínas, formando una especie de cápsula, que protege la estructura terciaria y la actividad de la proteína al deshidratarse (Lins et al., 2004) (Figura N°2 a).

La figura N°2 b muestra cómo la trehalosa protege a las membranas durante el proceso de deshidratación. Esto se debe a que la trehalosa interactúa con la bicapa favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando así la fusión, la separación de fases y el rompimiento de membranas (Crowe et al., 1984). Según Crowe et al. (2001) y Weisburg (1988) la trehalosa presenta una ventaja frente a la sacarosa en este proceso, ya que encaja entre los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos con los que interactúa mediante los hidroxilos (Mascorro Gallardo et al., 2005).

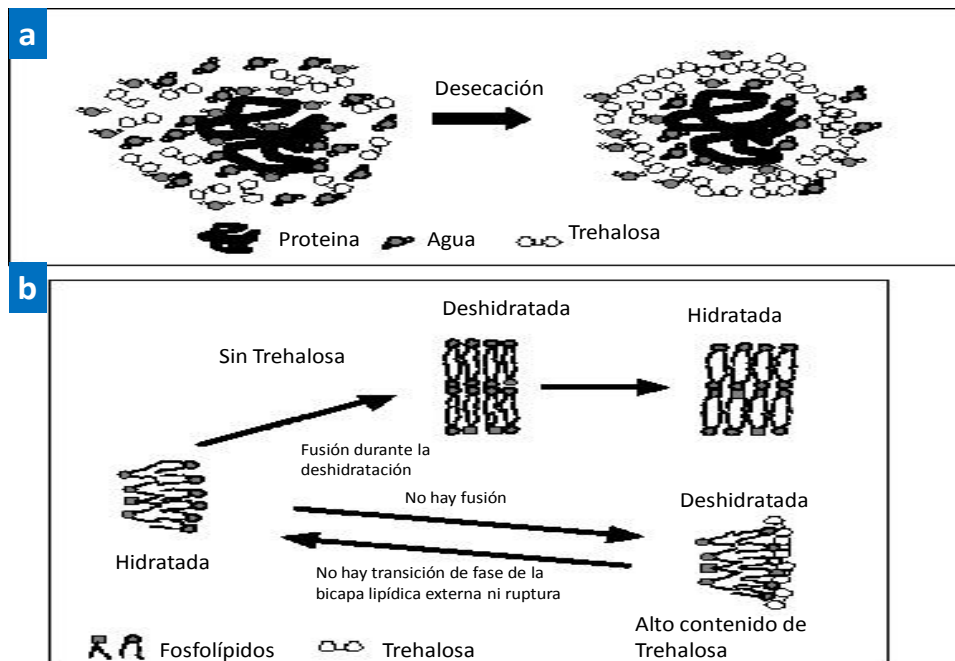


Figura N° 2: a. Acción de la trehalosa en la desecación de proteínas. b. Acción de la trehalosa en la bicapa lipídica. Fuente: Imágenes google.

La trehalosa presenta numerosas propiedades que le brinda la posibilidad de tener diversos usos, muchos explotados a nivel comercial hoy en día, y algunos usos potenciales importantes a descubrir (Mascorro-Gallardo et al., 2005). En la actualidad se la utiliza masivamente como protector de la actividad enzimática; estabilizador y protector de moléculas complejas; aditivos de diversos alimentos; sustituto del azúcar; preservador de células, tejidos y órganos; osmoprotector en plantas; marcador de selección en la producción de plantas transgénicas; uso en la industria de cosméticos y usos médicos y nutracéuticos (Iturriaga et al., 2009).

2.4.9. El uso de trehalosa para la conservación de semen

Existen gran cantidad de ensayos sobre el efecto crioprotector de la trehalosa en la viabilidad de espermatozoides de la especie ovina, mientras que en bovinos el número de estudios es menor.

La importancia de la trehalosa radica en que es un crioprotector no permanente que protege a la estructura de las membranas de los espermatozoides frente al estrés oxidativo y daños frente al shock de frío que se produce con el descenso de la temperatura (Hu et al., 2010).

Según Stornelli et al. (2005) la trehalosa cuenta con la propiedad de interactuar con los lípidos de membrana, limitando la fase de transición. La gran acción crioprotectora de este azúcar radica en que ejerce un efecto estabilizador de membrana, haciendo que ésta sufra menos con los cambios de temperatura. Para Maxwell et al. (1993), es un azúcar que no provee a los espermatozoides de fuente de energía, pero que actúa a nivel extracelular manteniendo la presión osmótica y la integridad de membrana, y por tales motivos, podría ser útil para almacenamiento de semen en estado líquido (López-Sáez et al., 2000).

Aisen et al. (2005), establece que el diluyente con trehalosa mejora la acción antioxidante y reduce el estrés oxidativo producido por la criopreservación. Para Yildiz et al. (2000), la trehalosa promueve la deshidratación celular, reduciendo el efecto negativo del flujo de agua de la membrana durante la congelación y la formación de cristales de hielo (Tonieto et al. 2010).

Dicha acción que protege al espermatozoide del congelamiento se encuentra relacionada al efecto osmótico que produce sobre las células y el medio (Sandoval et al., 2007). Según Aisen et al. (2000) y Purdy (2006), la trehalosa produce una presión osmótica que genera la deshidratación celular y disminuye la incidencia de formación de hielo intracelular al producirse la congelación (Khalili et al., 2009). Para Molinia et al. (1994) y Aisen et al. (2006), durante los procesos de deshidratación y rehidratación la trehalosa interactúa con los fosfolípidos de la membrana plasmática, produciendo una reorganización de la membrana, aumentando la fluidez disminuyendo la temperatura a la cual se produce la transición de fases (Khalili et al., 2009).

Aisen et al. (2002) argumenta que la trehalosa interactúa con los fosfolípidos y las proteínas de membrana, dándole a la membrana mayor flexibilidad frente a la criopreservación (Tonieto et al. 2010). Similares pensamientos tiene Foote et al. (1993), que establece que la trehalosa es un protector específico de las membranas espermáticas, que interacciona con los fosfolípidos, uniéndose con el hidrógeno de las cabezas fosfolípicas, de una manera más fuerte que el glicerol. Esta unión lleva a estabilizar a las membranas espermáticas durante la criopreservación.

Según Foote et al. (1993) diversos estudios realizados sobre las membranas artificiales (Rudolph et al. 1985 y 1986; Anchordoguy et al. 1986), demuestran que la trehalosa y la sacarosa brindan una mayor protección que el glicerol y por lo tanto la inclusión de estos azúcares en el medio de conservación le dará a las membranas una menor sensibilidad al daño a distintas temperaturas.

2.4.10. Resultados de ensayos evaluando la acción de la trehalosa

Hay gran cantidad de ensayos comparando la acción crioprotectora de la trehalosa, con distintos azúcares y medios de conservación, en distintas especies domésticas, siendo los resultados en gran número de ellos positivos, mientras que en otros no se observan resultados favorables.

Hu et al. realizó un ensayo en el año 2009 para medir el efecto de la adición de trehalosa sobre semen ovino criopreservado, en el cual observó que mejoraba significativamente la calidad del semen durante la criopreservación. Esto llevó a que realice en el año 2010 un ensayo evaluando el efecto de la suplementación con trehalosa sobre la calidad espermática y el estrés oxidativo en espermatozoides bovinos criopreservados (Hu et al. 2010). En este ensayo se evaluaron muestras con distintas concentraciones de trehalosa (0, 25, 50, 100 y 200 mOsm), observándose los mejores resultados de motilidad espermática, integridad de la membrana acrosomal y membrana plasmática para la muestra con 100 mOsm. A continuación se exponen los resultados obtenidos en el cuadro 6.

Parametro de evaluacion (%)	Control	Trehalosa 25mM	Trehalosa 50mM	Trehalosa 100mM	Trehalosa 200mM
Motilidad espermática	36.88±1.53 ^b	38.34±1.35 ^b	44.36±1.83 ^a	46.61±1.62 ^a	35.30±1.37 ^b
Integridad acrosomal	53.40±1.85 ^c	55.26±1.32 ^c	59.47±1.03 ^b	64.78±1.35 ^a	51.33±1.17 ^c
Integridad de membrana	36.32±2.11 ^b	36.87±1.95 ^b	38.73±1.74 ^b	44.33±1.71 ^a	34.43±2.14 ^b

Valores en la misma columna con diferente letra indican diferencias significativas (P<0,05)

Cuadro N° 6. Efecto de distintas concentraciones de trehalosa sobre motilidad espermática, integridad acrosomal e integridad de membrana en espermatozoides bovinos descongelados. Fuente: Hu et al. (2010).

Aisen et al. (2002), evaluó la tolerancia a la congelación de espermatozoides ovinos con diferentes concentraciones de trehalosa (0-400 mOsm). Se observaron mejores resultados de motilidad espermática, integridad acrosomal e hiposmotic swelling test (HOST) con concentraciones de 100 mOsm,

mientras que los valores de las dosis de 200-400 mOsm fueron inferiores. En estos estudios, se observó que la adición de trehalosa tenía efectos positivos sobre la motilidad espermática, pero que a partir de ciertas concentraciones elevadas se producía un efecto deletéreo sobre los espermatozoides. En el ensayo realizado por Hu et al. (2010) se llega a las mismas conclusiones al observar los menores resultados de la muestra con mayor concentración de trehalosa. Como conclusión de su estudio, Hu et al. (2010) manifiesta que en concentraciones óptimas de trehalosa no solo se aumenta los parámetros evaluados que se observan en el cuadro, sino que también se disminuye el estrés oxidativo provocado por la criopreservación.

Otro estudio que evalúa el efecto de la trehalosa en la especie ovina, fue realizado por Guerrero et al. (2009). En su ensayo evaluó el efecto de dos dilutores hipertónicos, uno con trehalosa y otro con lactosa en la criopreservación de semen ovino. Los resultados fueron favorables a la trehalosa ya que se obtuvieron mejores características de motilidad individual y espermatozoides vivos post-congelamiento.

Por otro lado, López-Sáez et al. (2000), evaluó la calidad seminal de semen ovino almacenado a 5°C, con distintos diluyentes. Los resultados del ensayo fueron favorables para el diluyente a base de tris-trehalosa. Similares resultados se observaron en el ensayo de Dinatolo (2011). En su estudio los resultados al agregar 100 mOsm de trehalosa fueron positivos sobre la refrigeración de semen ovino, sobre los parámetros de motilidad masal, espermatozoides vivos y motilidad individual progresiva. Por otro lado, Giménez Zapiola (2010), concluye en su ensayo que la trehalosa mejora la resistencia de la membrana plasmática, disminuyéndose el daño provocado por el frío y aumentándose el número de espermatozoides viables en semen refrigerado ovino.

Aisen et al. realizó otro ensayo comparando dilutores a base de tris+azúcares (fructosa, lactosa y trehalosa) para la congelación de semen ovino. Los resultados de motilidad individual, endósmosis positiva, y porcentaje de acrosomas intactos, post congelación fueron superiores para el diluyente que contenía tris-trehalosa.

Según ensayo realizado por Garde et al. evaluando la acción de la trehalosa y ETDA sobre la criopreservación de semen ovino, se llegó a la conclusión que la presencia de trehalosa mejora la criopreservación del semen ovino en comparación a un diluyente base. Otro autor que llega a la conclusión que la trehalosa brinda un efecto positivo fue Toniato et al. (2010), donde argumenta en su estudio que con 100 mOsm de trehalosa y 8% de LDL se pueden alcanzar resultados de motilidad espermática e integridad de membrana post descongelación en semen ovino similar a los obtenidos con diluyentes con crioprotectores tradicionales como la yema de huevo y el glicerol.

Para Woelders et al. (1997), tanto la trehalosa como la sacarosa mejoran la criopreservación de semen bovino criopreservado en un medio conformado por tris y yema de huevo. Los resultados obtenidos en su estudio demuestran que ambos azúcares protegen a los espermatozoides contra el rápido descenso de

temperatura al congelar el medio, siendo mejores los resultados obtenidos con sacarosa con respecto a trehalosa.

Por lo contrario, Foote et al. (1993), evaluó la fertilidad de semen bovino congelado con un medio a base de leche entera, con y sin agregado de trehalosa. Los resultados arrojaron que no hay diferencias significativas entre ambos medios, pudiéndose deberse a que la gran cantidad de calcio en la leche puede interferir en la acción crioprotectante de la trehalosa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 .Información general del ensayo

Las extracciones, con el posterior procesamiento del material seminal y el primer monitoreo del eyaculado (tiempo 0hs) se realizaron en el Centro de Altos Estudios Gándara (CAEG), ubicado en Verónica, partido de Punta Indio, provincia de Buenos Aires (a 138 Km de Capital Federal). Los análisis posteriores se efectuaron en el Laboratorio de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Católica Argentina (Freire 183, Colegiales, Capital Federal).

El ensayo se realizó entre el 11 de Agosto y el 22 de Septiembre del año 2011, mediante 7 viajes a campo (n=7) para recolección de semen. Se utilizaron 5 toros de fertilidad comprobada del rodeo general del CAEG, los cuales se repitieron a lo largo de todas las réplicas. Los eyaculados se obtuvieron en la manga del establecimiento, mediante electroeyaculación, realizándose en promedio una extracción semanal, siendo el período mínimo de descanso entre 2 extracciones de 5 días. La evaluación de los tratamientos se realizó sobre una muestra heteroespermática para disminuir el efecto toro, es decir, evitar llegar a resultados que no se puedan generalizar, ya que puede haber diferentes respuesta entre individuos a los tratamientos.

Debido a la considerable distancia (aproximadamente 300 metros) que separan a la manga del laboratorio del CAEG, se buscó un funcionamiento que evite la exposición del material seminal a bajas temperaturas (temperatura ambiente) como también se buscó agilizar y reducir el tiempo entre extracciones para obtener la muestra heteroespermática lo antes posible y no verse afectados los parámetros a evaluar. Por tales motivos, se procedió a actuar de la siguiente manera: dos personas trabajaron exclusivamente en la manga, para realizar la extracción; otra se encargó del traslado del material seminal desde la manga al laboratorio y por último, una persona se dedicó a la recepción, preparación y evaluación de las muestras en el laboratorio. A continuación, se procederá a explicar detalladamente el modo de actuar del equipo.

Previamente a comenzar el ensayo, los toros fueron encerrados para una evaluación externa del aparato reproductivo, revisión testicular y peneana y recorte de los pelos del prepucio.

3.2. Método de colección de los eyaculados

A lo largo del ensayo, las extracciones se realizaron siempre entre las 10 de la mañana y las 12 del medio día. Previo a la colecta del semen, se colocaba a los animales en la manga y luego de introducir el toro en el cepo se anotaba su número de caravana. Luego, se preparaba el electroeyaculador (ELECTROJAC IV) y una vez listo, se lubricaba la sonda rectal y se introducía por el ano en la región rectal ocupando la cavidad pelviana. El electroeyaculador está diseñado para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma se produce la erección peneana y la eyaculación (Angelino Olivera, 2009). Es importante que el operador regule el estímulo de manera intermitente y rítmica, aumentando su intensidad paulatinamente hasta culminar en la eyaculación. Al momento de la eyaculación se recogía la fracción del eyaculado rica en espermatozoides colocando el embudo con el tubo colector en la punta del glande del pene, y luego de sacar el tubo con el eyaculado del recolector era transportado inmediatamente al laboratorio del CAEG para ser evaluado. A continuación se expone una figura que demuestra la manera de actuar al momento de realizar las extracciones.

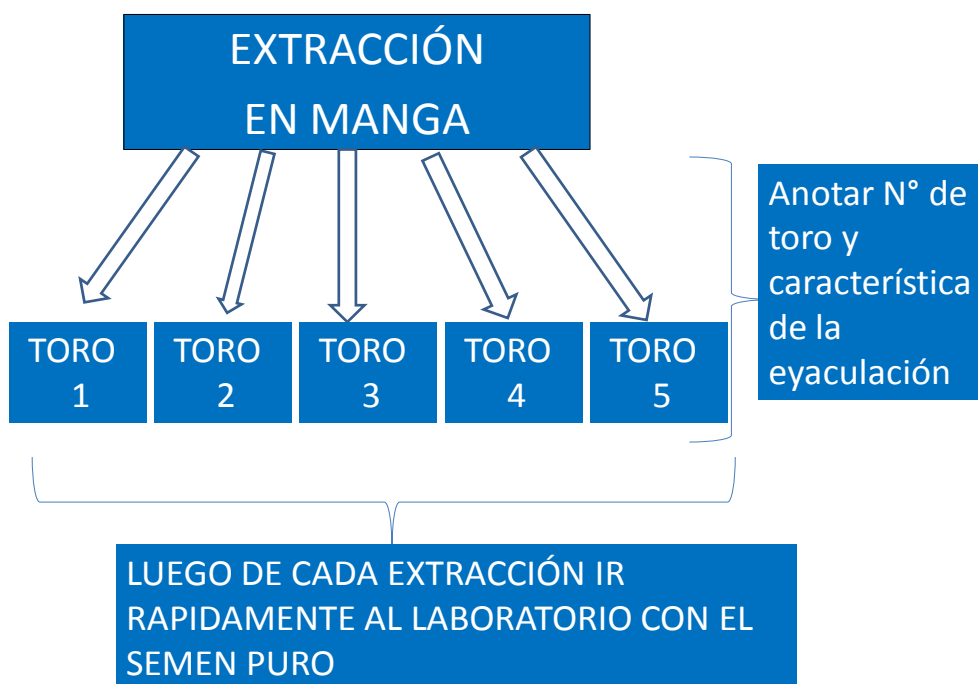


Figura N°3. Esquema de la recolección de semen en la manga

3.3. Preparación de los diluyentes

Hacia mediados de Julio, previamente a comenzar con los viajes de campo se prepararon los diluyentes a utilizar en todo el ensayo y se almacenaron en freezer a -80°C en el Laboratorio de Sanidad Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Católica Argentina. Se prepararon 600cc de diluyente, de los cuales 200cc se prepararon con trehalosa (para el tratamiento T) y 400cc sin trehalosa para los tratamientos control y refrigerado (C y R). Como

diluyente se utilizó Triladyl® (sustancia buffer que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, glicerina, agua purísima y antibióticos, elaborado por Minitüb, Alemania), con la adición de agua bidestilada apirógena y yema de huevo de gallina, en una proporción 1:3:1. Los 400cc de solución sin trehalosa se prepararon con 80cc de Triladyl®, 240cc de agua y 80cc de yema de huevo de gallina. A los otros 200cc, compuestos por 40cc de Triladyl®, 120cc de agua y 40cc de yema se le agregaron 150 mOms de trehalosa. Se colocaron los diluyentes en tubos Falcon de 50ml y se almacenaron en el freezer.

Al momento de partir hacia el campo, se tomaba un tubo con diluyente (con 40ml) y otro con diluyente más trehalosa (con 20ml) y rumbo al campo los mismos se descongelaban. Una vez arribado al laboratorio del CAEG, se tomaban 15 tubos de ensayo, se los rotulaba con las letras T, R y C y con numeración de 1 a 5. Luego, se colocaban con una pipeta electrónica 3 ml de diluyente solamente para los tratamientos R y C y 3 ml en los tubos T de diluyente con trehalosa. Una vez que los tubos se encontraban con el contenido, se introducían a baño maría a 35-37°C y se esperaba la llegada de los eyaculados. La siguiente figura clarifica los pasos a seguir desde la extracción de los tubos desde el freezer hasta el laboratorio.

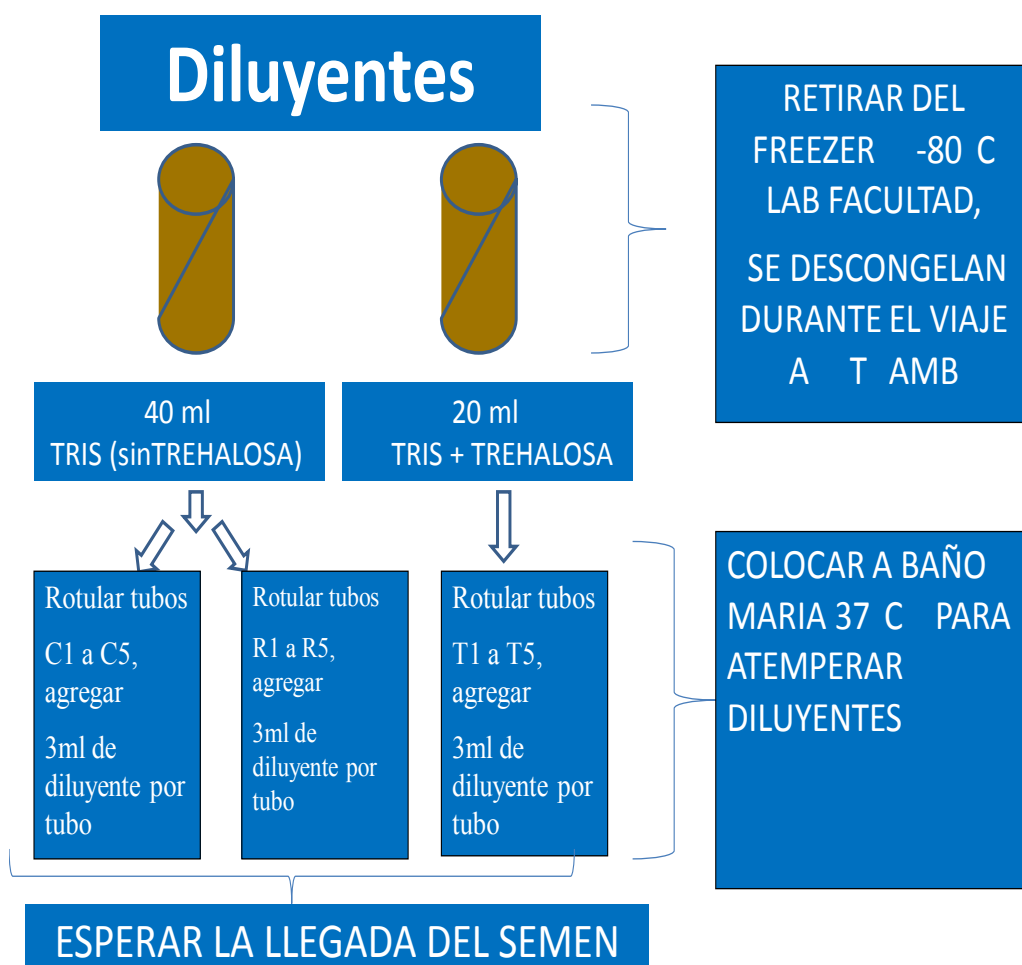


Figura N° 4: Esquema del manejo de los diluyentes

3.4. Preparación de la muestra heteroespermática

Al arribar la muestra de semen puro al laboratorio, lo primero a realizarse era una evaluación macroscópica del eyaculado. Se registraba el número de toro y características del eyaculado como el volumen, color, densidad y presencia de cuerpos extraños. El volumen se observaba directamente sobre el tubo graduado con el cual se obtenía el eyaculado. Según Gómez y Migliorisi, el volumen puede variar entre 2 y 12 ml, y en toros con más de 2 años debe ser mayor a 4 ml. En este caso los eyaculados se encontraron dentro de estos parámetros, e incluso algunos toros superaron estos volúmenes llegando hasta 15 ml.

Con respecto al color, son normales los colores que van del blanco al amarillento, y son considerados patológicos los colores rosado amarronado y verdoso. Todos los eyaculados se clasificaron como normales.

El semen según su densidad puede clasificarse en acuoso, lechoso, lechoso cremoso y cremoso, estando relacionado directamente con su concentración espermática. Cuanto más cremoso, mayor concentración. Se considera muy bueno cuando es cremoso espeso (750.000 a 1 millón o más de espermatozoides/mm³), bueno cuando es lechoso (400.000 a 750.000 esp/ mm³), regular cuando es lechoso aguachento (250.000 a 400.000 esp/ mm³) y pobre cuando es translúcido (menos de 250.000esp/ mm³) (Gómez y Migliorisi).

Además, se observaba en el eyaculado la posible presencia de cuerpos extraños que indiquen alguna anomalía. Los datos obtenidos no formaban parte de la evaluación principal del ensayo pero se tomaron como medida de control de cada toro, para evitar en el caso de que haya algún toro defectuoso incluirlo en el ensayo.

Luego, se procedía a colocar 1 ml de eyaculado puro del toro 1 en los tubos C1, R1 y T1, repitiéndose el procedimiento a medida que llegaban los eyaculados de los demás toros. Entre la llegada de una muestra y otra, se realizaba una evaluación microscópica de cada tubo (C_x, R_x y T_x) que contenía semen con diluyente, observando motilidad de masa y se realizaba una estimación del porcentaje de vivos, con el fin de evaluar que el toro en particular no presente problemas en su eyaculado que pueda afectar la muestra, en ese caso, se tenía pensado la eliminación de la muestra del pool, pero esto nunca sucedió. Luego, la muestra se conservaba a 35-37°C.

Una vez obtenidos, evaluados y fraccionados los 5 eyaculados, se procedía a realizar el pool heteroespermático. Se colocaban los contenidos de los tubos de ensayo C1 a C5 en un tubo Falcon de 50 ml y se hacía lo mismo con los tubos R y T. Los pasos mencionados para hacer llegar a la muestra heteroespermática se observan en la figura N°5.

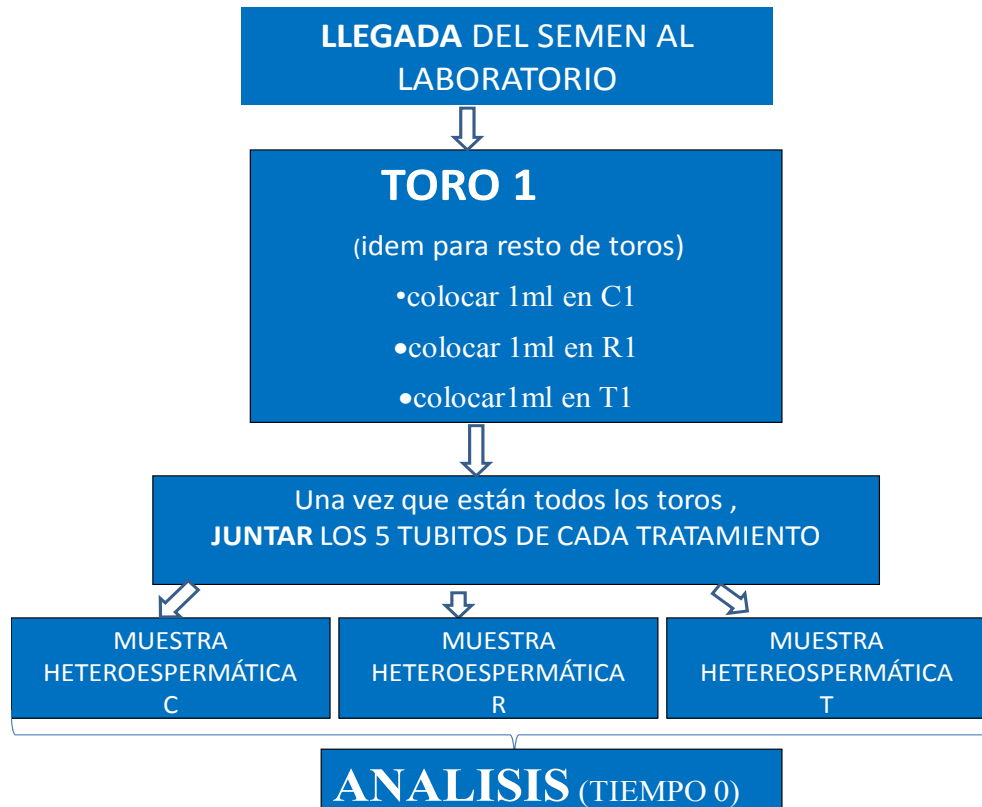


Figura N°5: Gráfico que demuestra cómo realizar el pool heteroespermático.

3.5. Separación en tratamientos

A partir de este momento, se le daban 3 tratamientos diferentes:

Control (C): Se almacenaba la muestra sin refrigeración, manteniéndose a temperatura ambiente en el laboratorio (18-22°C).

Refrigerado (R): se almacenaba la muestra de semen con diluyente con refrigeración entre 5 y 7°C.

Trehalosa (T): se almacenaba la muestra con semen, diluyente más trehalosa a temperatura de refrigeración entre 5 y 7 °C.

El tratamiento C se colocaba en una gradilla sobre la mesada del laboratorio (a temperatura ambiente 18-22°C) y se realizaba la evaluación del tiempo 0 hs, mientras que los otros tubos debían pasar de 35-37°C a 5-7°C. Este proceso debe realizarse progresivamente, disminuyendo 2°C cada 3 minutos, para evitar el shock de frío. Esta operación se realizaba de la siguiente manera: a una heladera de tergopol se le agregó una estructura para sostener 2 tubos Falcon de 50 ml, y se le agregaba agua a 35-37°C procedente del baño maría. Se colocaban ambos tubos (R y T) y con un cronómetro se tomaba el tiempo. A medida que transcurría el tiempo se debían tirar pequeños trozos de hielo, y mezclar con una varilla para homogenizar la temperatura. Con un termómetro se controlaba la temperatura del agua, mientras se observaba el cronómetro. Luego de 48 minutos,

el agua llegaba a 5 °C y se mantenía a esa temperatura durante todo el tratamiento. A continuación se puede apreciar un gráfico con la curva de refrigeración.

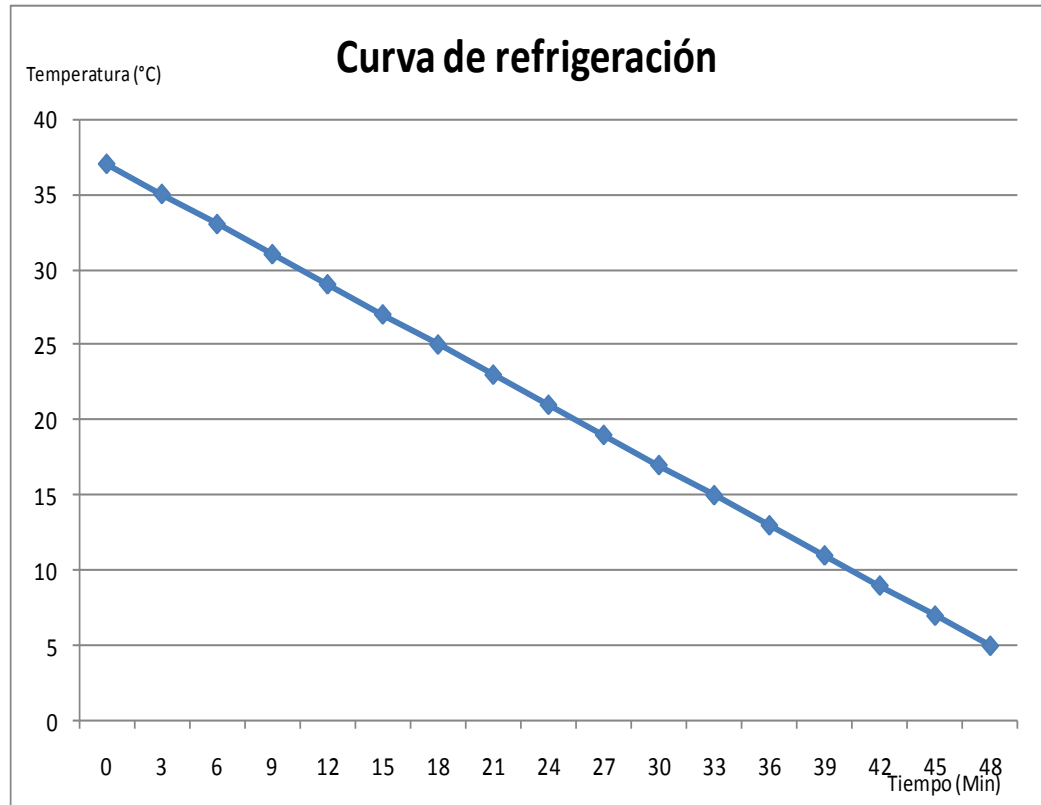


Figura N°6: Curva de refrigeración.

Al alcanzar los 5°C, se procedía a realizar el monitoreo de la hora 0 para los tratamientos R y T. Se evaluaba motilidad masal (MM), motilidad individual progresiva (MIP) y porcentaje de espermatozoides vivos mediante tinción con eosina (%vivos). Luego, se colocaba la heladerita con las muestras en una heladera de tergopol de mayor tamaño y se colocaba hielo a los costados. Así se mantenía la temperatura a 5°C durante el viaje de regreso a la Facultad de Ciencias Agrarias y una vez en la misma se colocaban las muestras en una heladera del Laboratorio de Reproducción Animal, en donde se conservaban y se sacaban exclusivamente al momento de realizar la evaluación (6, 12, 24, 48 y 72hs).



Figura N°7: Esquema de los pasos a seguir desde la obtención de la muestra heteroespermática.

3.6. Métodos de evaluación de viabilidad *in vitro*

En todos los tiempos de monitoreo (0, 6, 12, 24, 48 y 72hs) se midieron parámetros de viabilidad microscópicos como son motilidad masal (MM), motilidad individual progresiva (MIP) y porcentaje de vivos (%vivos) mediante tinción con eosina.

Para que el ovocito pueda ser fecundado, es importante que el espermatozoide cumpla una serie de requisitos, entre los cuales es fundamental su motilidad. Según Muiño-Otero, el movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular (Muiño-Otero). Según Den Daas (1992); Holt y Van Look (2004), un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (Muiño-Otero).

Según Barth (2000), la MM es el resultado de la concentración espermática, el porcentaje con células con movimiento progresivo y la velocidad de movimiento de los espermatozoides, que provocan un movimiento en flujo y la presencia de remolinos y ondas omega. La evaluación de la motilidad espermática puede realizarse mediante estimación visual o mediante sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). La estimación visual se caracteriza por ser subjetiva, pero es utilizada ya que es un método simple, rápido y barato para estimar la motilidad espermática (Muiño et al., 2005).

En el ensayo se realizó estimación visual. Para su medición se colocaba una gota de la muestra heterospermática de 10 µl sobre el portaobjetos atemperado a 36-37°C y se observaba sin colocar un cubreobjetos sobre el borde de la gota con un microscopio óptico de contraste de fases a 40 aumentos (Nikon Eclipse E200). Se debe evaluar cerca del borde de la gota, donde la profundidad de la misma es menor y es más fácil de observar (Gómez y Migliorisi).

Se realiza una evaluación subjetiva que comprende una escala de 1 a 5, siendo 5 el puntaje de mayor movimiento cuando se observan oleadas o remolinos rápidos y vigorosos y 0 cuando no se observa movimiento. Se considera como el valor mínimo me aceptación 3 (Gómez y Migliorisi).

A continuación se expone un cuadro con los tipos de movimiento según puntuación.

Escala	Nombre	Tipo y aspecto de movimiento
0	Muertos	Inmovilidad total
1	Muy pobre	Movimiento individual
2	Pobre	Movimientos lentos
3	Regular	Movimiento ondulado general, amplitud lenta de las ondas
4	Bueno	Movimiento ondulado rápido, sin remolinos
5	Muy Bueno	Movimientos rápidos, con remolinos y ondas

Cuadro N°7: Cuadro evaluación MM. Fuente Hafez E.S.E; Hafez B. 2000.

Para evaluar la MIP de la muestra se observa al microscopio y se valora subjetivamente los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, tratando de seguir a un espermatozoide a lo largo del campo de observación. Si un espermatozoide tiene un movimiento oscilatorio o en círculo se considera que tiene un movimiento anormal. La evaluación se realiza sobre una escala subjetiva de 1 a 5 y con sus respectivos porcentajes, siendo el valor mínimo de aceptación el 50% (Gómez y Migliorisi).

Escala	Porcentaje	Tipo y aspecto del movimiento
0	0%	No hay desplazamiento de los espermatozoides
1	11-20%	Desplazamiento muy lento o movimientos en el lugar
2	31-40%	Desplazamiento lento con agitaciones y movimientos desorganizados, algunos se desplaza rápidamente.
3	51-60%	Los espermatozoides realizan su desplazamiento en forma curvilínea sin agitación, cuesta seguirlos.
4	71-80%	Desplazamientos rápidos, algunas células con trayectoria rectilínea, otras con trayectoria curva, se ven pasar pero es imposible seguirlos.
5	91-100%	Desplazamiento rectilíneo y rápido, imposible seguirlos.

Cuadro N° 8: Cuadro evaluación MIP. Fuente: Elaboración en base a cuadros de Giménez Zapiola y Dinatolo.

Para su determinación se colocaban 5 μ l en un portaobjetos previamente atemperado a 35°C en platina térmica, y se colocaba por encima de la gota un cubreobjetos. Luego, se evaluaba con 100 X los movimientos de los espermatozoides.

Para realizar el test de vitalidad, mediante una tinción con eosina, lo primero a realizar fue la preparación de los reactivos, la cual se realizó con anticipación al viaje. Para ello, primero se disolvieron 0,9 gr de NaCl en 100 ml de agua destilada, y luego se agregaron 0,5 gramos de eosina Y a la solución preparada. Luego, una vez obtenidas las muestras de semen se procedía a tomar una alícuota de 1 μ l de semen y mezclarla con otra de 1 μ l de solución de eosina en un portaobjetos atemperado a 35°C. Con el tip de la pipeta, se procedía a mezclar hasta la obtención de un producto homogéneo. Luego de realizar la mezcla, se contabiliza mediante cronómetro unos 30-40 segundos. Se repetía el mismo procedimiento en otro portaobjeto. Al pasar los 30-40 segundos, se tomaba otro portaobjeros para realizar un frotis, y a continuación se realizaba un frotis a la segunda muestra. Luego de sacudir el frotis para que se seque se contabilizaba en el microscópico los espermatozoides teñidos (muertos) y sin teñir (vivos). Se contaba 2 veces hasta 100 espermatozoides, y luego el otro frotis. Al final se calculaba el porcentaje de vivos, y en caso de que había una gran diferencia entre ambos frotis se hacía nuevamente la operación. Según Gómez y Migliorisi se considera como valor mínimo aceptable el 70% de espermatozoides vivos.

La siguiente figura muestra los pasos a seguir a la hora de realizar el frotis para evaluar el porcentaje de vivos mediante tinción con eosina.

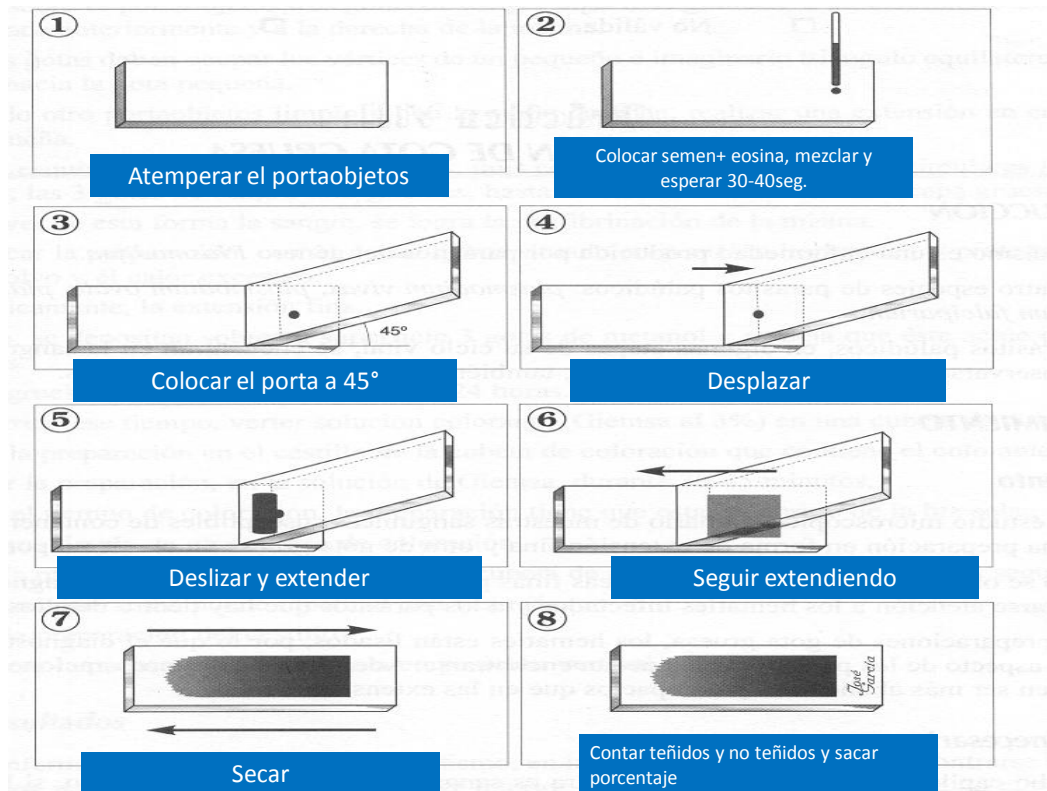


Figura N°8: Dibujo con los pasos a seguir para realizar el frotis. Fuente: Imágenes google.

3.7. Diseño experimental

La figura 9 demuestra de manera simplificada el diseño experimental del ensayo.

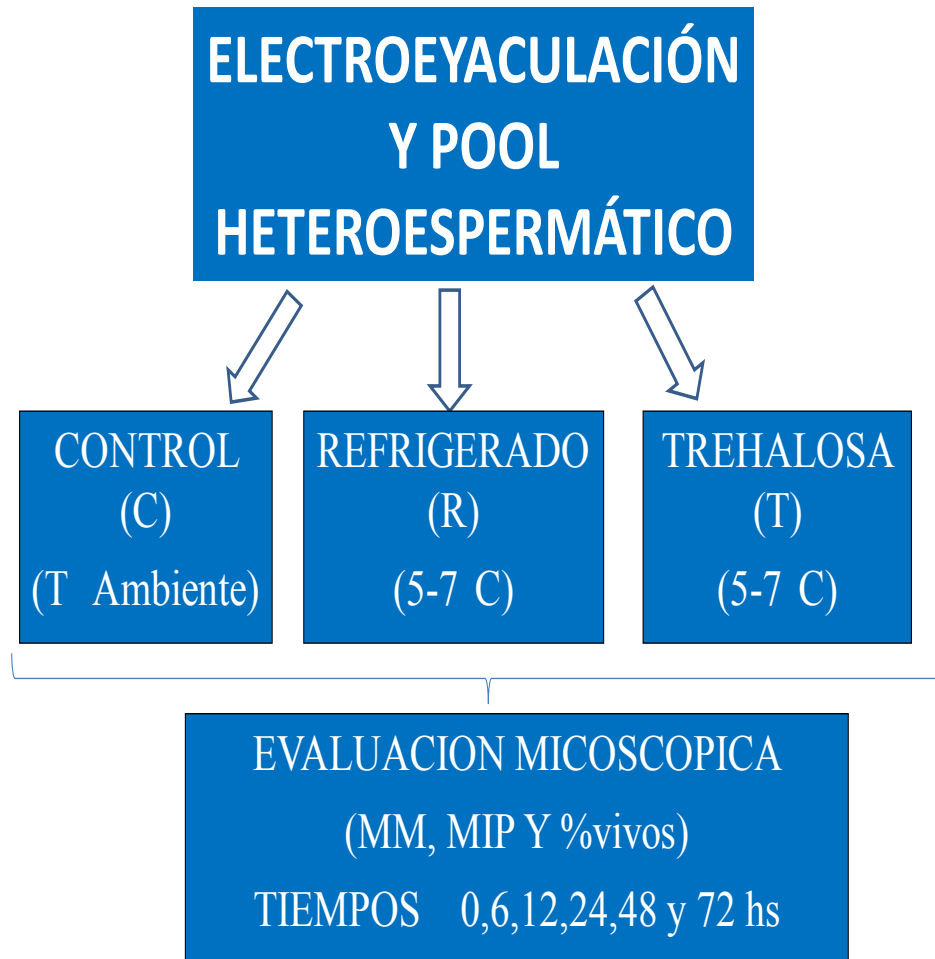


Figura 9: Esquema del diseño experimental del ensayo.

3.8. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de los datos obtenidos en el ensayo con el software estadístico *Infostat* (Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008). *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Para realizar el análisis se utilizó un diseño de medidas repetidas.

4. RESULTADOS

La siguiente sección cuenta con cuadros y gráficos que contienen los resultados obtenidos en el ensayo, los cuales se expondrán separadamente según el método de evaluación realizado (MM, MIP, %vivos).

4.1. Resultados de la evaluación de la Motilidad en Masa

A continuación es posible observar un gráfico de perfiles que demuestra cómo varía la MM en las distintas horas de evaluación, y las diferencias de valores entre tratamientos.

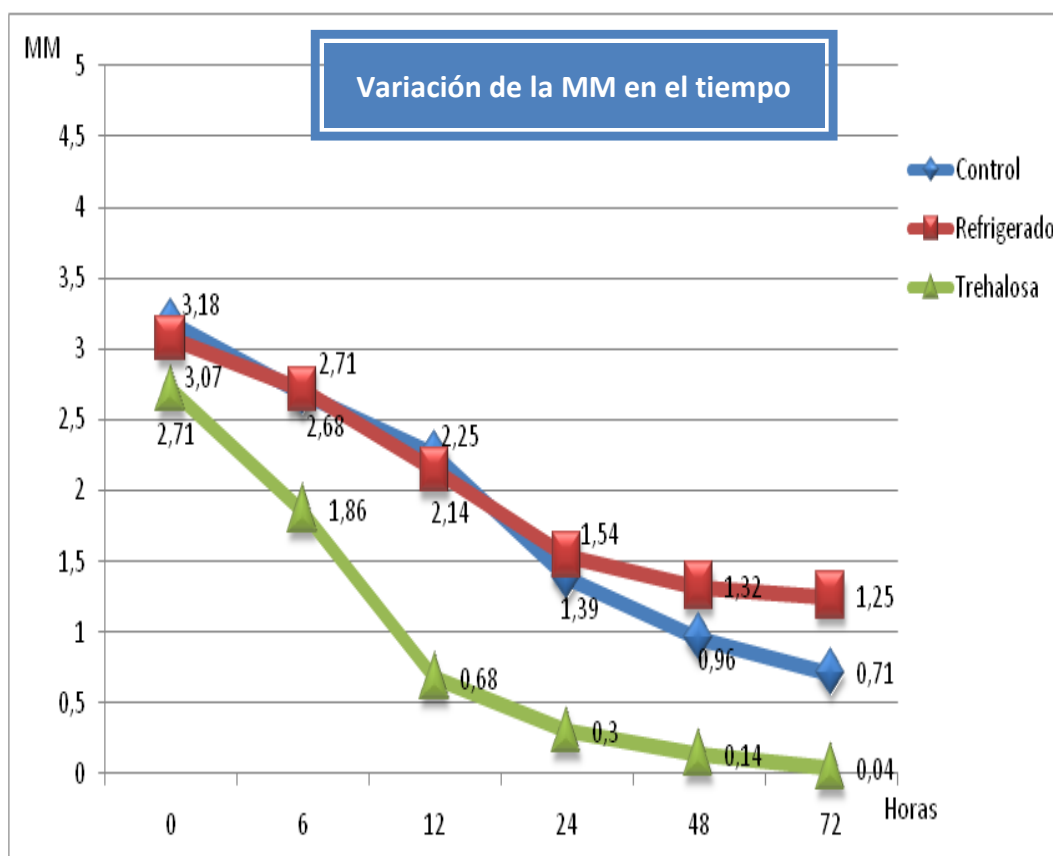


Gráfico N°2: Gráfico de perfiles de la variación de la MM en el tiempo.

El gráfico claramente demuestra la tendencia del ensayo, en donde el tratamiento T presenta los valores más bajos de MM desde el comienzo (hora 0) y se acentúan con el tiempo. Mientras que los tratamientos C y R presentan resultados con escasas diferencias hasta las 24hs y luego hay una diferencia positiva a favor del tratamiento R, ya que el valor de MM no disminuye en forma tan marcada entre las 24-72hs como lo hace el tratamiento C.

El próximo cuadro presenta medidas de resumen como son la media, el desvío estándar, el coeficiente de variación, el valor mínimo y el máximo de cada momento en particular según los tratamientos.

MOTILIDAD MASAL						
TRATAMIENTO	TIEMPO	MEDIA	D.E.	C.V.	MIN	MAX
C	0	3,18	0,28	8,75	2,75	3,50
	6	2,68	0,28	10,39	2,50	3,25
	12	2,25	0,29	12,83	2,00	2,75
	24	1,39	0,45	32,53	1,00	2,00
	48	0,96	0,22	23,33	0,50	1,25
	72	0,71	0,27	37,42	0,50	1,00
R	0	3,07	0,28	9,06	2,75	3,50
	6	2,71	0,17	6,36	2,50	3,00
	12	2,14	0,20	9,18	2,00	2,50
	24	1,54	0,42	27,29	1,00	2,00
	48	1,32	0,28	21,05	1,00	1,75
	72	1,25	0,25	20,00	1,00	1,50
T	0	2,71	0,37	13,48	2,25	3,00
	6	1,86	0,50	26,76	1,25	2,75
	12	0,68	0,28	40,99	0,50	1,25
	24	0,39	0,13	34,02	0,25	0,50
	48	0,14	0,20	137,69	0,00	0,50
	72	0,04	0,09	264,58	0,00	0,25

Cuadro N°9: Cuadro con medidas de resumen de MM.

El siguiente gráfico de barras demuestra las diferencias significativas en los valores de MM, entre tratamientos y tiempos. Las diferencias se calcularon según la prueba de Tukey con el Infostat, y las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

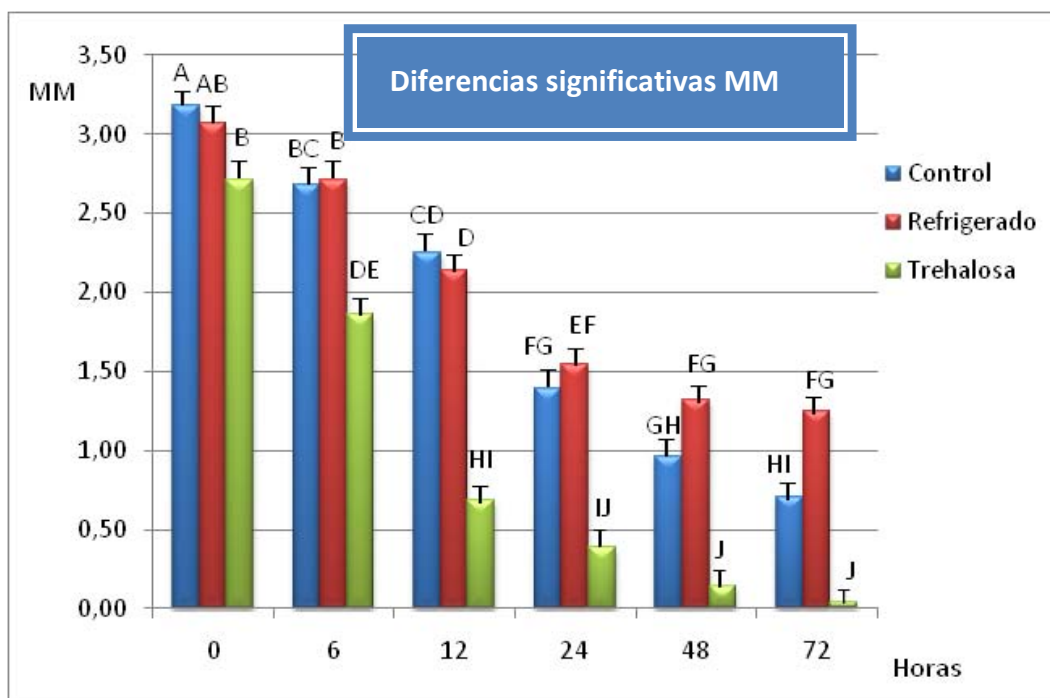


Gráfico N°3: Diferencias significativas entre tratamientos y tiempos (MM).

En el gráfico de barras puede apreciarse como al momento 0 el tratamiento C tiene una diferencia significativa, pero pequeña sobre el R (3,18 vs 3,07), mientras que el resultado del tratamiento T es claramente inferior (2,71). Luego hay pequeñas diferencias entre los tiempos 6, 12 y 24 para los tratamientos C y R, que se acentúan a partir de las 24 horas. Al pasar el día de almacenamiento, el tratamiento R presenta valores superiores, sin observarse una marcada caída (1,25 MM a las 72 hs). Por lo contrario, el tratamiento C sufre un importante descenso en la MM a partir de las 24 hs, siendo marcadamente inferior los valores a las 48 y 72 hs (0,96 y 0,71) con respecto al tratamiento R. Por último, claramente se puede observar como el tratamiento T tiene los peores valores del ensayo a partir de las 12 horas (siendo de 0,68 a las 12 horas y luego más bajo).

En las tres medidas de análisis (Gráficos N°2 y N°3 y Cuadro N°9), se demuestra los resultados de MM del ensayo. Como resumen de estos resultados se puede decir que los valores más bajos son para el tratamiento con trehalosa, mientras que el tratamiento control y refrigerado, en los primeros momentos de evaluación son similares, y luego de las 24-48 hs el valor de MM es superior para el tratamiento R.

4.2. Resultados de la evaluación de la Motilidad individual progresiva

El primer gráfico de la siguiente sección es un gráfico de perfiles, que muestra la tendencia de los valores de MIP obtenidos en el ensayo.

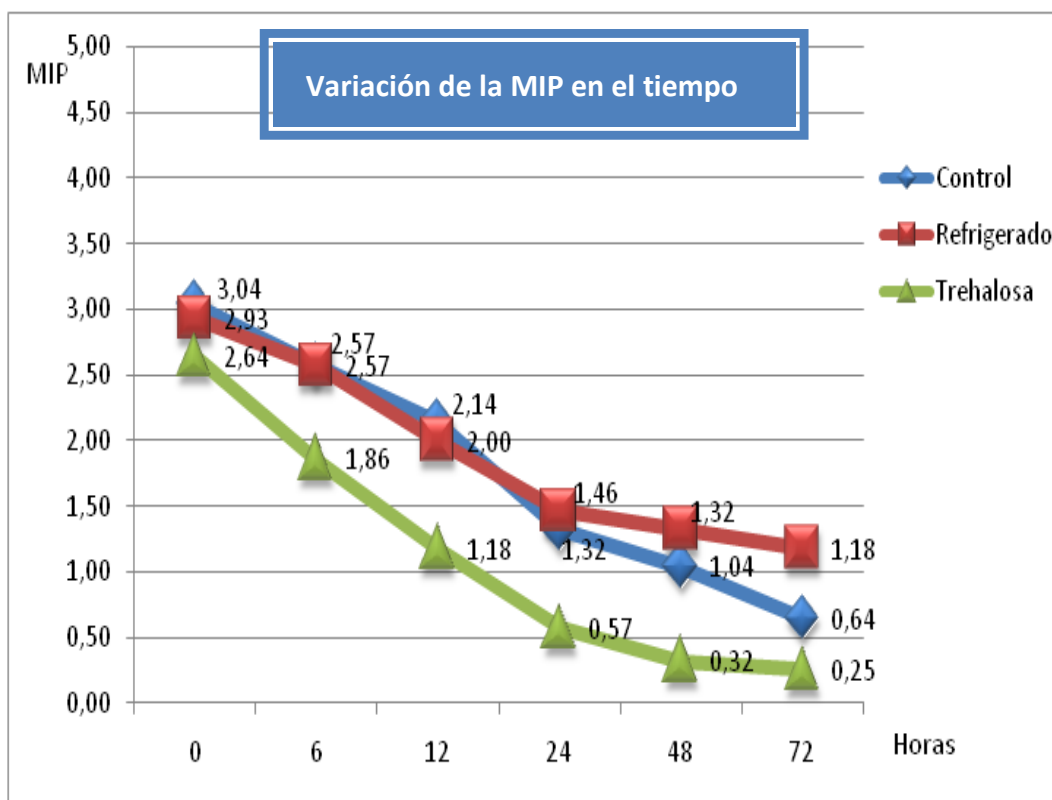


Gráfico N° 4: Gráfico de perfiles de la variación de la MIP en el tiempo.

En el Gráfico N°4, se observa una tendencia de la MIP similar a la obtenida en la MM. Los valores de las primeras mediciones son similares para los tratamientos R y C, mientras que luego de las 24 hs hay una diferencia favorable al tratamiento R. Con respecto a los valores del tratamiento T son inferiores a lo largo de todas las mediciones del ensayo.

El siguiente cuadro expone una serie de medidas de resumen obtenidas con el Infostat. Se aprecian valores de la media, el desvío estándar, el coeficiente de variación, el valor mínimo y el máximo, de los distintos momentos de evaluación de la MIP.

MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA						
TRATAMIENTO	TIEMPO	MEDIA	D.E.	C.V.	MIN	MAX
C	0	3,04	0,37	12,06	2,50	3,50
	6	2,57	0,28	10,82	2,25	3,00
	12	2,14	0,35	16,30	1,75	2,50
	24	1,32	0,37	28,30	1,00	2,00
	48	1,04	0,34	32,47	0,50	1,50
	72	0,64	0,20	30,60	0,50	1,00
R	0	2,93	0,37	12,77	2,50	3,50
	6	2,57	0,19	7,35	2,25	2,75
	12	2,00	0,25	12,50	1,75	2,50
	24	1,46	0,30	20,74	1,00	2,00
	48	1,32	0,24	18,00	1,00	1,50
	72	1,18	0,24	20,18	1,00	1,50
T	0	2,64	0,48	18,00	2,00	3,50
	6	1,86	0,35	18,81	1,50	2,50
	12	1,18	0,43	36,15	0,75	2,00
	24	0,57	0,31	54,84	0,25	1,00
	48	0,32	0,12	37,95	0,25	0,50
	72	0,25	0,00	0,00	0,25	0,25

Cuadro N°10: Cuadro con medidas de resumen de MIP.

A continuación se muestra las diferencias significativas que se encuentran entre tiempos y tratamientos al realizar la prueba de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos y se exponen en el siguiente gráfico de barras.

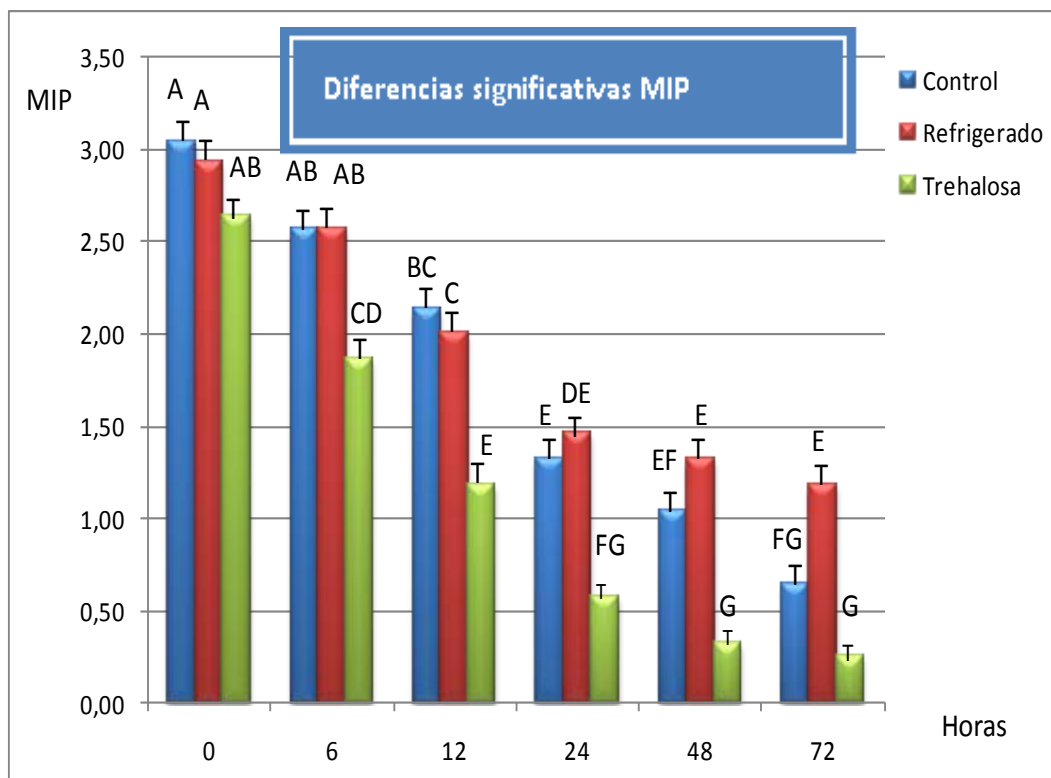


Gráfico N° 5: Gráfico de MIP, diferencias significativas.

No hay diferencias significativas en el tiempo 0 para los tratamientos R y C (3,04 y 2,93), mientras que el T 0 es levemente menor (2,64). Luego los resultados de R y C a las 6 y 12 hs son mayores al tiempo T 6. El valor a las 24 horas para R es levemente superior al C, a partir de allí, los resultados de R son superiores a los de C (24, 48 y 72 son 1,46; 1,32 y 1,18 contra 1,32; 1,04 y 0,64). La evaluación T 12 presenta valores similares al C 24 y R 48. Por último, se puede apreciar que los valores T 24, 48 y 72 representan las evaluaciones más bajas de MIP en el ensayo (0,57; 0,32; 0,25).

4.3. Resultados de la evaluación de la tinción vital con eosina

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el ensayo sobre el porcentaje de espermatozoides vivos mediante tinción vital con eosina. Se observa en el gráfico de perfiles el valor superior para el tiempo C 0 con el 81,12 % de espermatozoides vivos, luego le sigue el R 0 con 76,46 % y el T 0 con 69,86 %. En el gráfico número 6 se ve como varían los valores a través del tiempo. Los valores de C son superiores a los de R hasta las 24 horas, y luego pasan a ser inferiores, terminando a las 72 horas con un 51,75% de espermatozoides vivos. El tratamiento R es el que mayor cantidad de espermatozoides vivos mantiene al finalizar el ensayo, siendo de 61,32 % a las 72 horas. Por último, el tratamiento T es el que peores valores tiene a lo largo de todos los tiempos, llegando a un 45,64 % a las 72 horas.

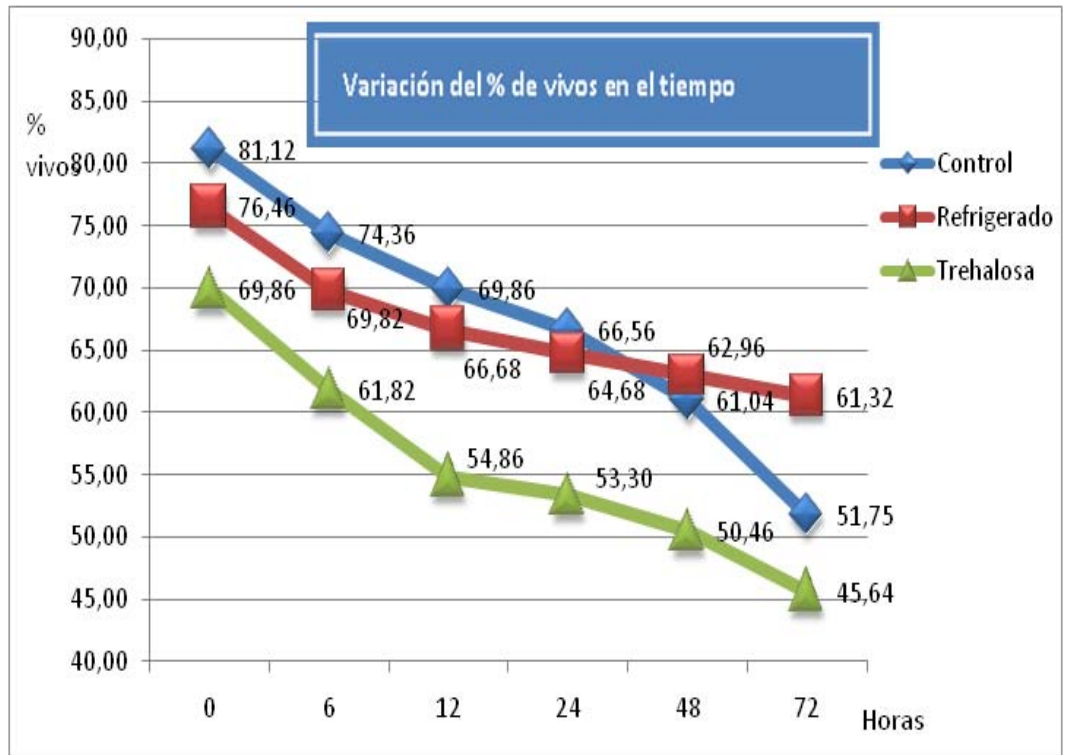


Gráfico N°6: Gráfico de perfiles de la variación de la %vivos en el tiempo.

El cuadro número 11, muestra medidas de resumen del % de vivos obtenidas con el Infostat, y es expuesto a continuación.

PORCENTAJE DE VIVOS						
TRATAMIENTO	TIEMPO	MEDIA	D.E.	C.V.	MIN	MAX
C	0	81,12	5,07	6,25	70,50	84,74
	6	74,36	3,13	4,21	68,75	77,75
	12	69,86	4,53	6,49	61,50	74,50
	24	66,56	3,23	4,85	62,00	70,00
	48	61,04	4,86	7,96	55,00	68,25
	72	51,75	6,36	12,28	42,75	61,00
R	0	76,46	4,60	6,02	67,25	80,00
	6	69,82	2,54	3,64	65,00	72,25
	12	66,68	3,51	5,26	61,75	70,50
	24	64,68	3,81	5,89	60,00	69,50
	48	62,96	3,68	5,84	59,00	68,00
	72	61,32	3,76	6,13	56,00	66,50
T	0	69,86	3,76	5,39	65,25	75,00
	6	61,82	2,84	4,60	58,00	67,00
	12	54,86	1,87	3,41	52,50	57,00
	24	53,30	4,39	8,24	44,00	57,00
	48	50,46	2,69	5,33	46,75	53,25
	72	45,64	3,76	8,25	39,25	51,00

Cuadro N°11: Cuadro con medidas de resumen de % vivos.

El próximo gráfico de barras muestra las diferencias estadísticas entre tratamiento y tiempos. Las diferencias entre letras demuestran que hay diferencias significativas ($p < 0,05$).

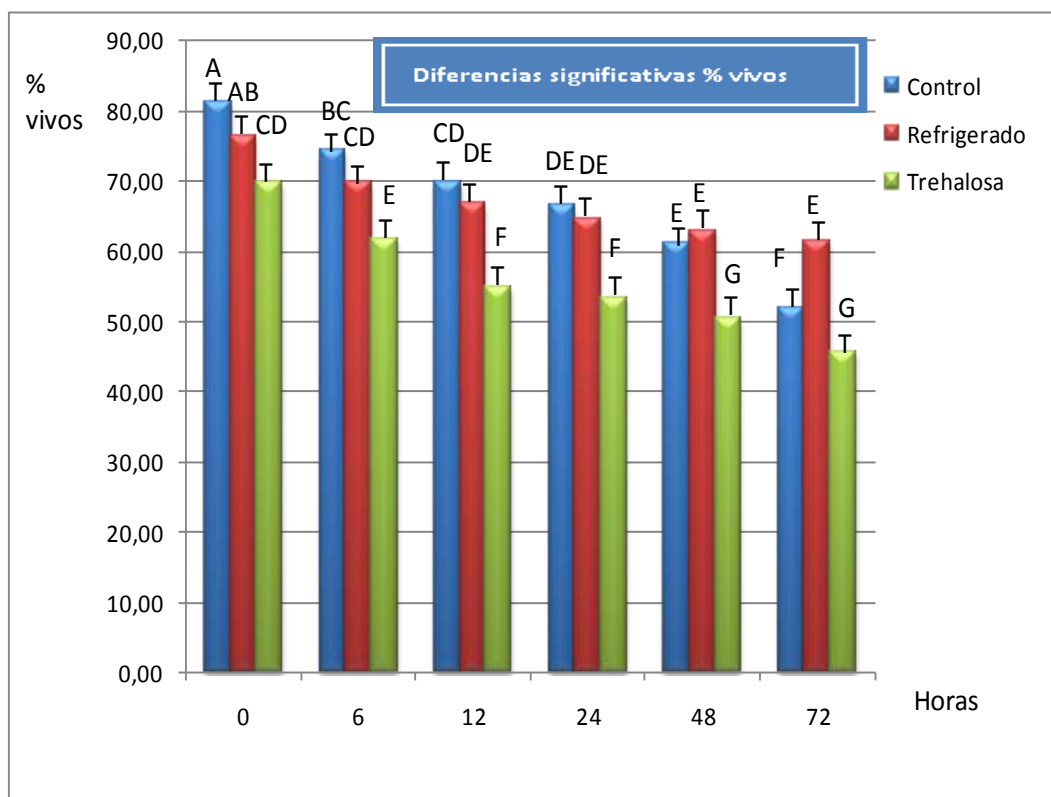


Gráfico N°7: Gráfico de barras del las diferencias significativas entre tratamientos (% vivos).

Como resumen de los gráficos 6 y 7 y el cuadro N°11, se puede decir que los valores de C y R son similares en los primeros momentos de análisis, mientras que a partir de las 24 horas del estudio hay un marcado descenso de los valores de C mientras que R se mantiene mejor. A lo largo de todo el ensayo los valores de T presentan los más bajos porcentajes de espermatozoides vivos.

5. DISCUSIÓN

La implementación de semen refrigerado en un programa de IATF sería beneficioso ya que podría generar un aumento en la eficiencia y la rentabilidad de la producción, al reducir significativamente el costo de la dosis de semen por utilizar menor cantidad de espermatozoides por dosis inseminante (Martínez y López).

Dado que la principal falencia del almacenamiento de semen en estado refrigerado es su corta vida útil (Vishwanath y Shannon, 2000), en este estudio se busca evaluar la incorporación de un crioprotector no permanente como la trehalosa, para ver si se puede prolongar la viabilidad de los espermatozoides.

Hasta el momento se han realizado numerosos estudios sobre la acción de la trehalosa en diferentes especies domésticas, siendo en la mayoría de los ensayos los resultando positivos. Para el presente trabajo se han utilizado investigaciones sobre la utilización de trehalosa para la preservación de semen, siendo predominante los ensayos encontrados sobre semen criopreservado y pocos sobre semen refrigerado. Además, la implementación de este azúcar para la conservación de semen bovino no es aún utilizada tan masivamente como en semen ovino. Los trabajos de investigación utilizados para el presente estudio se realizaron tanto con semen congelado, ovino (Hu et al., 2009; Aisen et al., 2002; Tonieto et al., 2010; Guerrero et al., 2009; Garde et al.) y bovino (Hu et al. 2010; Woelders et al. 1997), como con semen ovino refrigerado (López-Sáez et al., 2000; Dinatolo, 2011, Giménez Zapiola, 2010), pero no se han encontrado antecedentes de estudios evaluando la acción crioprotectora de la trehalosa sobre semen refrigerado bovino.

Los resultados obtenidos en el presente ensayo indican que la adición de 150 mOsm de trehalosa en semen refrigerado bovino tiene un efecto negativo sobre los parámetros evaluados de motilidad masal, motilidad individual progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos. Estos resultados, no fueron los esperados al realizar el ensayo ya que se esperaba comprobar la acción crioprotectora de la trehalosa, a través de una mejora en los parámetros a evaluar sobre semen refrigerado. No obstante, los resultados obtenidos pueden coincidir con lo argumentado por Hu et al., (2010) y Aisen et al., (2002), que indican que altas concentraciones de trehalosa tienen un efecto tóxico sobre la viabilidad de los espermatozoides, y es por eso que los valores para el tratamiento con trehalosa fueron inferiores al tratamiento control y al refrigerado. En el ensayo de Hu et al. (2010) sobre el efecto de la trehalosa sobre la viabilidad del semen bovino criopreservado se encuentran menores resultados con una concentración de 200 mOsm de trehalosa con respecto a la de 100 mOsm, pero no realiza la evaluación con 150 mOsm. Según los resultados obtenidos en el presente estudio, con 150 mOsm se produce una reacción similar a la evaluada por Hu et al. (2010) con 200 mOsm, observándose un efecto adverso en vez de resultados positivos. Los mismos resultados obtuvo Aisen et al. (2002) en semen criopreservado ovino, al observar que la tolerancia de los espermatozoides a la congelación-descongelación disminuía notablemente con dosis de trehalosa entre 200-400 mOsm.

Con respecto a los resultados de los demás tratamientos, en los primeros tiempos de evaluación, hasta las 24 horas se obtienen valores similares de motilidad masal, motilidad individual progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos tanto con el tratamiento control como el refrigerado. Luego de las 24 horas, se observa que el semen refrigerado mantiene mejores valores mientras que el tratamiento control cae marcadamente. Esto se debe a que las bajas temperaturas de almacenamiento (5-7°C) reducen la actividad metabólica de los espermatozoides, prolongando su vida útil, mientras que el semen almacenado a temperatura ambiente sus parámetros de viabilidad decaen rápidamente (Vishwanath y Shannon, 2000). Según estos autores, los motivos por el cual se observa este rápido descenso en la fertilidad en semen almacenado a temperatura ambiente se deben principalmente a 3 factores: uno es el estrés oxidativo extracelular que sufren los espermatozoides a temperatura ambiente; otro factor de

estrés es debido al plasma seminal y por último, otro causante de la baja en la fertilidad es la producción de radicales libres endógenos. Según Vishwanath y Shannon (2000) la combinación de estos 3 factores puede verse en un importante daño sobre los espermatozoides y ser una de las razones por las cuales el semen almacenado a temperatura ambiente tiene una vida útil tan corta.

Igualmente, por más que el semen almacenado a 5°C presenta una reducción en la actividad metabólica, no todos los cambios observados son beneficiosos (Vishwanath y Shannon, 2000).

Los resultados del ensayo presentan similitudes con lo presentado por Vishwanath y Shannon (2000) en donde enfatiza que la vida útil de un eyaculado almacenado en refrigeración oscila entre 2 y 4 días. El tratamiento refrigerado fue el que mejores parámetros de motilidad masal, individual progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos presentó a las 24, 48 y 72 horas de almacenamiento. Igualmente, los resultados contrastan con lo expuesto por Lemma (2011), en donde argumenta que la motilidad no disminuye de manera significativa en las primeras 24-48 horas. Si bien con el almacenamiento a 5°C se obtuvieron los mejores resultados y el descenso de las características seminales evaluadas no fue tan marcado como en los otros tratamientos, el descenso en los parámetros de motilidad fue considerable entre los momentos evaluados, pasando de 3,07 en el momento 0hs a 1,54 en el 24, 1,32 a las 48 y 1,25 a las 72hs. Además, Lemma (2011) argumenta que el semen almacenado entre 5-8°C puede estar hasta 96hs sin un marcado descenso de la fertilidad. Con los resultados in vitro obtenidos en este estudio es probable que esto no sea así ya que los valores no son muy elevados. Habría que realizar la evaluación de los eyaculados mediante inseminación de vacas para ver cómo es el descenso de la fertilidad con el tiempo. Según Gerard, si se conserva semen refrigerado durante 3 días, se puede observar una pérdida en la tasa de no retorno entre el día 0 y el 3 de hasta 10 puntos de fertilidad (Decuadro-Hansen).

Por lo tanto, con los resultados obtenidos en el presente estudio es posible realizar IATF con semen refrigerado, permitiendo una importante disminución en los costos de las dosis de semen. No obstante, se aconseja inseminar dentro de las 24 horas de obtenidos el eyaculado, para obtener mejores resultados. Los resultados no permiten solucionar el principal problema de la conservación del semen refrigerado que es su corta vida útil, lo cual complica la implementación de esta forma de almacenar el semen en un sistema productivo. La corta duración del semen implica menor flexibilidad a la hora de inseminar, menor flexibilidad frente al acontecimiento de un problema y menores distancias alcanzadas desde donde se extrae el semen y se realiza la inseminación. Disminuyendo los efectos del paso del tiempo sobre los espermatozoides, podría producirse un aumento en la eficiencia y la utilización del semen refrigerado de manera significativa (Vishwanath y Shannon, 2000).

6. CONCLUSIONES

- La conservación de semen bovino en estado refrigerado (5-7°C) permite mantener parámetros de viabilidad seminal como motilidad masal, motilidad individual progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos en mejores condiciones que a temperatura ambiente por más tiempo.
- Es posible realizar IATF con semen refrigerado, esperando los mejores resultados utilizando el semen dentro de las 24 horas de extraído. Es probable que si se insemina con semen almacenado a temperatura ambiente durante las primeras 24 horas se obtengan similares logros a los alcanzados con semen refrigerado ya que sus valores microscópicos en ese lapso fueron similares.
- La incorporación de 150 mOsm de trehalosa resulta perjudicial para los espermatozoides, presentando peores valores con respecto al diluyente sin trehalosa, ya sea conservado refrigerado o a temperatura ambiente.
- Sería útil evaluar en próximos ensayos distintas concentraciones de trehalosa para determinar concentraciones óptimas a utilizar con semen refrigerado bovino.
- Además, se considera de importancia evaluar la viabilidad del semen analizado mediante inseminaciones, para poder apreciar como varían los índices de preñeces entre tratamientos y tiempos de conservación.

7. ANEXOS

7.1. Anexo fotográfico

Imagen N° 1: Laboratorio CAEG.



Imagen N° 2: Laboratorio UCA.



Imagen N° 3: Traspaso de diluyentes con pipeta electrónica (CAEG).



Imagen N° 4: Pipeta electrónica (CAEG).



Imagen N° 5: Baño maría a 35°C (CAEG).



Imagen N° 6: Platina atemperada con diferentes tips y portas (CAEG).



Imagen N° 7: Electroeyaculador y colector de semen.



Imagen N° 8: Electroeyaculador ELECTROJAC IV.



Imagen N° 9: Toro en el cepo.



Imagen N° 10: Introducción del electroeyaculador via rectal.



Imagen N° 11: Recolección de semen por el médico veterinario Eduardo Martínez.



Imagen N° 12: Recipiente de tergopol para realizar curva de refrigeración y almacenar los tubos R y T.



Imagen N° 13: Termómetro marcando la temperatura de almacenamiento de los tubos R y T (5°C).



Imagen N° 14: Motilidad Masal.

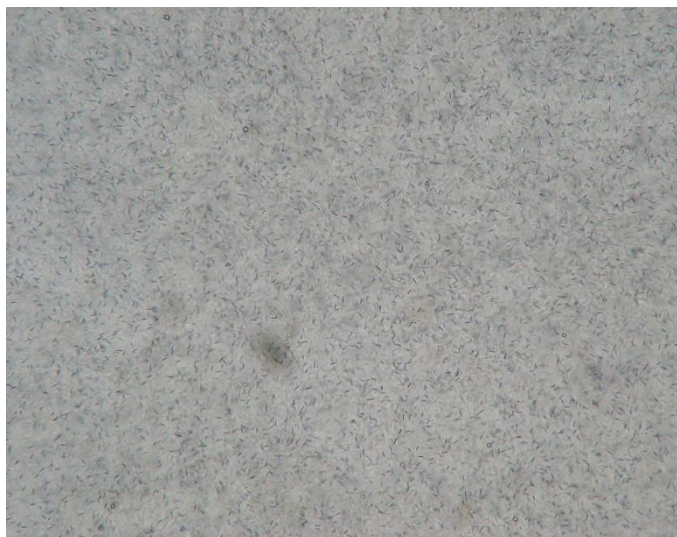
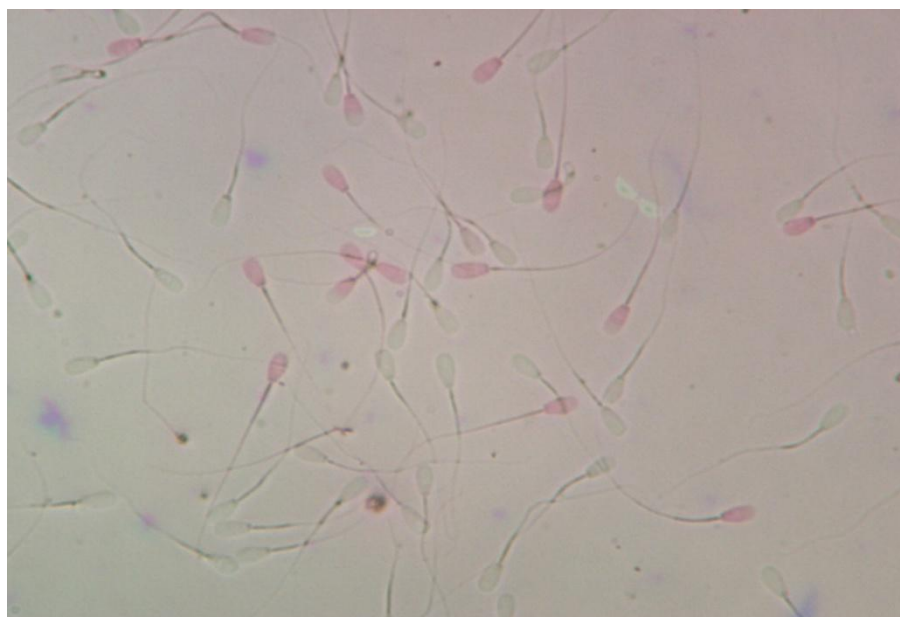


Imagen N° 15: Tinción con eosina (los espermatozoides teñidos están muertos y los sin teñir vivos).



7.2. Anexo cuadros

Cuadro N°12: Cuadros para anotar los resultados de las mediciones.

Viaje N°..... : fecha:

Tratamiento :A (temp. amb)

	tiempos					
Evaluacion	0hs	6hs	12hs	24hs	48hs	72hs
MM						
MIP						
% vivos(eosina 1step)						

Tratamiento :B (refrig. 5-7°C)

	tiempos					
Evaluacion	0hs	6hs	12hs	24hs	48hs	72hs
MM						
MIP						
% vivos(eosina 1step)						

Tratamiento C: (refrig. + trehalosa)

	tiempos					
Evaluacion	0hs	6hs	12hs	24hs	48hs	72hs
MM						
MIP						
% vivos(eosina 1step)						

Pasos a seguir y cuadro de chequeo para realizar la curva de refrigeración

- Materiales: termo de boca ancha, termómetro (graduación 1 en 1), varilla de vidrio, chips de hielo.
- Colocar los tubitos a refrigerar de las muestras heteroespermáticas de tratamientos R y T.
- Agregar agua a 37°C del baño maría y luego chips de hielo e ir revolviendo con varilla.
- Luego de refrigeración realizar evaluación microscópica.
- Durante el viaje controlar temperatura 5-7°C agregando hielo.

Cuadro N°13: Cuadro de chequeo de la curva de refrigeración

Temperatura	Tiempo (min)	Chequeo
37	0	
35	3	
33	6	
31	9	
29	12	
27	15	
25	18	
23	21	
21	24	
19	27	
17	30	
15	33	
13	36	
11	39	
9	42	
7	45	
5	48	

Cuadro N°14: Cuadros evaluación individual toros.

VIAJE N°1 FECHA 11/8			
N° toro	Evaluacion macroscópica	Eval. Microscópica	Observaciones
1502	12cc cremoso/lechoso.	MM 3,5 MIP 3/3,5 70-80%vivos	OK
17732	15cc cremoso/lechoso	MM 4 MIP 4 90%vivos C2 MM 3,5	Trabajo bien
17738	15cc cremoso/acuoso	MM 3,5/4 MIP 3 80%vivos C4 MM3 78-80%vivos MIP 3/3,5	Eyaculó con pene extendido
17109	4cc cremoso/lechoso	MM 4,5 MIP 5 90-95%vivos T3 MM 3 90%vivos MIP 4	Trabajo bien
1000	12cc cremoso/lechoso	MM 3,5/4 MIP 3 80%vivos C5 MM 3,5 60%vivos MIP2,5/ 3	Trabajo bien
VIAJE N°2 FECHA 18/8			
N° toro	Evaluacion macroscópica	Eval. Microscópica	Observaciones
1502	15cc cremoso/lechoso.	MM 4,5 T MM 4 R 4-4,5	OK
17732	8cc cremoso/lechoso	MM 4 R MM 3,5	OK
17738	8cc cremoso/lechoso	MM 3,5/4 T MM 3	OK

VIAJE N°3 FECHA 25/8			
N° toro	Evaluacion macroscópica	Eval. Microscópica	Observaciones
1502	12cc cremoso/lechoso.	MM 4,5 R 3,5-4	OK
17732	12cc cremoso/lechoso	MM 4 C MM 3,5 T MM 3	OK
17738	12cc cremoso/lechoso	MM 4,5 T MM 3 R MM 3,5-4	OK
17109	8cc cremoso/lechoso	MM 4-4,5 C MM 3-3,5	OK
1000	8cc cremoso/lechoso	MM 3,5-4 C 3,5MM T MM 3	OK
VIAJE N°4 FECHA 30/8			
N° toro	Evaluacion macroscópica	Eval. Microscópica	Observaciones
1502	12cc cremoso/lechoso.	MM 3,5-4 R 3,5 T 3-3,5	OK
17732	10cc cremoso/lechoso	MM 4-4,5 C MM 3,5-4 T MM 3,5	OK
17738	10cc cremoso/lechoso (+diluido)	MM 3,5 T MM 2,5-3 R MM 3	OK
17109	7cc cremoso/lechoso	MM 4-4,5 C MM3,5-4 T 3,5	OK
1000	6cc cremoso/lechoso	MM 3,5 C 3-3,5MM T MM 3	OK

VIAJE N° 5 FECHA 5/9			
N° toro	Evaluacion macroscópica	Eval. Microscópica	Observaciones
1502	5cc cremoso/lechoso.	MM 4 R 3,5 T 3	OK
17732	11cc cremoso/lechoso	MM 3,5 C MM 3 T MM 2,5	OK
17738	8cc cremoso/lechoso	MM 4 T MM 3 R MM 3,5	OK
17109	9cc cremoso/lechoso	MM 4,5 C MM3,5 T 3	OK
1000	5cc cremoso/lechoso	MM 3,5-4 C 3 MM T MM 2,5	OK

VIAJE N° 6 FECHA 10/9			
N° toro	Evaluacion macroscópica	Eval. Microscópica	Observaciones
1502	10cc cremoso/lechoso.	MM 3,5 R 3 T 2,5	Costó largar verga. Orinó al final
17732	11cc cremoso/lechoso	MM 3,5-4 C MM 3,5 T MM 2,5	Se cayó
17738	7cc cremoso/lechoso	MM 4,5 T MM 3 R MM 3,5	Trabajó bien.
17109	12cc cremoso/lechoso	MM 3-3,5 C MM3 T 2,5	Primero dio muy puro y concentrado, después dio diluido. Presentó aglutinaciones.
1000	9cc cremoso/lechoso	MM 3,5-4 C 3 MM T MM 2-2,5	Trabajó bien.

VIAJE N° 7 FECHA 22/9			
N° toro	Evaluacion macroscópica	Eval. Microscópica	Observaciones
1502	9cc cremoso/lechoso.	MM 3 R 2,5 T 2,5	Costó largar verga. Color del semen amarillento. Posible infección.
17732	8cc cremoso/lechoso	MM 4 C MM 3 T MM 2,5	Trabajo bien.
17738	5cc cremoso/lechoso	MM 4,5 T MM 3,5 R MM 3,5	Trabajó bien.
17109	4cc cremoso/lechoso	MM 4,5 C MM 3,5 T 3	Trabajo bien.
1000	6cc cremoso/lechoso	MM 3,5 C 3 MM T MM 2-2,5	Trabajó bien.

8. AGRADECIMIENTOS

A mi profesor tutor Eduardo Martínez, por su ayuda brindada a lo largo de todo el trabajo, en especial en los viajes a campo, los cuales disfrute mucho.

A la profesora Marina Sansiñena, por ser tan importante en el ensayo, ayudándonos a armar el proyecto y a desarrollarlo. Gracias por su paciencia en innumerables consultas, y por demostrar siempre sus ganas de enseñar y transmitir su pasión sobre la investigación.

Gracias a la Universidad Católica Argentina y a la Facultad de Ciencias Agrarias por permitirme utilizar las instalaciones tanto del campo como los laboratorios de la Facultad y proveer de los materiales utilizados a lo largo del ensayo.

A Juan Carlos y Claudia, los encargados del campo por su importante ayuda y su cálida bienvenida cada vez que fuimos al campo.

A todos los compañeros y amigos (Diego De martino, Alejandro Sáez Reale, Santiago Rossi, Erica Kirschenbilder y Natalia Salinas Somoza), que me acompañaron al campo y ayudaron transportando la muestra desde la manga al laboratorio.

Gracias a todas las personas que me acompañaron al primer viaje frustrado, que sirvió para ajustar la forma de actuar en los siguientes viajes.

Al personal del Laboratorio de Sanidad Animal y el de Reproducción Animal por su ayuda, compañía y permitirme el uso materiales e instalaciones.

Al personal administrativos y de seguridad, por permitirme que me quede hasta altas horas de la noche y abrirme el laboratorio incluso los días sábados y domingos.

Por último, muchísimas gracias a todos mis familiares y amigos por haberme ayudado y bancado todos estos años de estudio. Un agradecimiento especial a mis padres por haberme dado la posibilidad de estudiar y apoyarme siempre en todo. A mis hermanos por su compañía y a mi novia por estar siempre a mi lado.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aisen, E.G; Medina, V.H.; Venturio, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Laboratorio de Teriogenología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina. *Theriogenology* 2002 Abril 15; 57(7):1801-8.
- Aisen E.G.; Alvarez, H.; Venturino, A.; Larreguy, D.; Garde, J. Evaluación “*in vitro*” de 4 diluyoservadores empleados en la congelación de semen de ovinos en la Patagonia. XIX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia.
- Allende, R. (2007). ¿Por qué hacer inseminación artificial? Cámara argentina de inseminación artificial, Buenos Aires, Argentina.
- Almenar, C.T. (2007). Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Angelino Olivera, J.N. (2009) Manual de evaluación de semen en bovinos. Trabajo práctico educativo para la obtención de título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, México.
- Bailey, J.L.; Bilodeaud, J.; Cormier, N.(2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating Phenomenon. Centre de recherche en biologie de la reproduction, Département des sciences animales, Université Laval, Québec, Canada. *Journal of Andrology* Vol 21, N°1. Enero/Febrero 2000.
- Bailey, J.L.; Morrier, A.; Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. Centre de recherche en biologie de la reproduction, Département des sciences animales, Université Laval, Québec, Canada. *Canadian Journal of Animal Science* **83**: 393–401.
- Barth, A.; Bó, G.; Tribulo, H. (2000). Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal. Universidad Católica de Córdoba, 2000. 3-10,55p.
- Bavera, G. A. (2005). Inseminación Artificial. Cursos de Producción Bovina de Carne, FAV UNRC.
- Bó, G.A.; Tegli, J.C. (2005). Sincronización de celos e inseminación a tiempo fijo en ganado de carne. Asociación Braford Argentina.
- Bols, P.E.J.; Langbeen A.; Verberckmoes S.; Leroy J.L.M.R. (2010). Artificial insemination in livestock production: the Vet’s perspective. F, V & V IN OBGYN, 2010, MONOGRAPH: 6-12.
- Brogliatti, G.M. El impacto de la calidad seminal en los programas de IATF. Director técnico del Centro Genético Bovino de Eolia SA y del Centro de Inseminación Artificial La Argentina Chica. Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires.
- Brogliatti, G.M. (2006). Manejo eficiente de la inseminación artificial a tiempo fijo. *Revista Angus*, 232: 36-40. VIª Convención Anual Angus. Buenos Aires, Argentina.
- Butler, H.M.; Cesaroni, G. (2007). Nuevas técnicas para inseminación artificial a tiempo fijo. Cámara Argentina de Biotecnología e Inseminación Artificial.

- Carballo Guerrero, D.M. (2005). Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. Tesis profesional para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana, México.
- Cutaia, L.E. (2007). Estudio comparativo de preñeces obtenidas por unidad de tiempo utilizando inseminación artificial a celo detectado (IACD) e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Universidad Católica de Córdoba, Syntex S.A.
- Cutaia, L.E. Impacto de la inseminación artificial a tiempo fijo sobre la tasa de preñez en rodeos lecheros. Universidad Católica de Córdoba, Syntex S.A. Revista Nuestro Holando, Bs.As., 49(541):41.
- Cutaia, L.E. (2006). Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF): una herramienta para el mejoramiento genético. Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Universidad Católica de Córdoba.
- Cutaia, L.E; Bó, G.A. Uso de la tecnología de IATF en rodeos lecheros. Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Universidad Católica de Córdoba.
- Decuadro-Hansen G. Manejo de semen en un programa de IATF: aspectos críticos para preservar la fertilidad. Ceva Santé Animale, France.
- Decuadro-Hansen G. (2011). Situación actual y perspectivas de las biotecnologías reproductivas a nivel mundial. Ceva Santé Animale, France.
- Dinatolo, E.F. (2011). Efecto de la trehalosa en la viabilidad de semen ovino refrigerado. Trabajo final de graduación para optar por el título de Ingeniero en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina.
- Foote, R. H. Artificial insemination from the origins up to today. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- Foote, R.H.; Chen, Y.; Brockett, C.C. (1993). Fertility of bull spermatozoa frozen in milk extender with trehalose, taurine and blood serum. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, New York, USA. Journal of Dairy Science, 1993, 76: 1908-1913.
- Foote, R.H. (2002) The history of artificial insemination: selected notes and notables. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, USA. American Society of Animal Science.
- Foulkes, J.A. (1977). The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Cattle Breeding Centre, Shinfield, U.K. J. Reprod. Fert. (1977). 49, 277-284.
- Garde, J.; Venturio, A.; Álavarez, H.; Larreguy, D.; Aisén, E. Efecto del ácido etilendiaminotetracético sobre la criopreservación de semen ovino en diluyentes iso e hipertónicos. Actas de las XXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia.
- Giménez Zapiola, C. (2010). Preservación de germoplasma ovino: utilización de HOST y tinción vital para evaluar la viabilidad espermática post-refrigeración. Trabajo final de graduación para optar por el título de Ingeniero en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina.

- Gómez M.V.; Migliorisi A.L. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Cátedra Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.
- Guerrero, H.V.; Huanca,W.L.; Raymundo, F.T.; Huerta, S.O.; Ramos, D.D. (2009). Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. *Rev Inv Vet Perú* 2009; 20 (1): 41-46.
- Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62 _2000. 3–22.
- Hu, J.H.; Zan, L.S.; Zhao, X.L.; Li, Q.W.; Jiang, Z.L.; Li, Y.K.; Li, X. (2010). Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bobine semen. *Journal of animal Science* 2010.
- Iordachescu, M.; Imai, R. Trehalose and abiotic stress in biological systems. National Agriculture and Food Research Organization, Japan.
- Iturriaga, G.; Suárez, R.; Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos, México. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10, 3793-3810.
- Khalili, B.; Farshad, A.; Zamiri, M.J.; Rashidi, A.; Fazeli, P. (2009). Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz goat spermatozoa. Department of Animal Science, College of Agruculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. *Asian- Australian Journal of Animal Science*, Vol 22, N° 12, Diciembre 2009 : 1614-1619.
- Leblic, D. (2007). Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF): una técnica posible en carne y leche. *Producir XXI*, Buenos Aires, Argentina, 15(191):50-52.
- Lemma, A. (2011). Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. Addis Ababa University, School of Veterinary Medicine, Debre Zeit, Ethiopia. *Artificial insemination in farm animals*, edited by Milad Manafi, 2011. Capítulo 12.
- López-Sáez, A.; Ortiz, N.; Gallego, L.; Garde, J.J. (2000). Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. Dpto. Ciencia y Teconología Agroforestal, ETSIA, Universidad de Castilla. La Mancha, Campus Universitario, Albacete, España. *Archives of Andrology* 44:155-164(2000).
- Marcantonio, S.A. (2007). Inseminación artificial a tiempo fijo. *El molino*, Argentina, 1(1):8-13.
- Martínez, E.J.; López A. Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en rodeos de cría utilizando semen fresco. *Proyectos de investigación y experimentación*, Centro de Altos Estudios Jorge Gándara, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina.
- Martínez, E.J. *Manual de inseminación artificial. Curso para auxiliares de inseminación*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina.
- Mascorro Gallardo J.O.; Avonce N.; Iturriaga, G.(2005). Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo*, serie horticultura, Julio-Diciembre vol 11, número 002. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. Pp. 193-202.
- Membrillo Ortega, A.; Córdova Izquierdo, A.; Hicks Gómez, J.J.; Olivares Corichi I.M.; Martínez Torres, V.M.; de Jesus Valencia Méndez, J. (2003).

Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Revista Interciencia*, Diciembre, año 28 número 12, pp 699-704. Caracas, Venezuela.

- Morrel, J.M. (2011). Artificial insemination: current and future trends. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Artificial insemination in farm animals, edited by Milad Manafi, 2011. Capítulo 1.
- Muiño- Otero, R. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis presentada para la obtención de grado de Doctor, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Muiño, R.; Fernández, M.; Areán, H.; Viana, J.L.; López, M.; Fernández, A.; Peña, A.I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación de semen bovino en Centros de Inseminación Artificial. *ITEA*, vol 101, (3), 175-191.
- Navarro, M. Inseminación Artificial. Manual Ganadero Rosenbusch, Capítulo 2.
- Roa, N. (2005) Método y aplicación de la inseminación artificial en bovinos. Manual de ganadería doble propósito, Capítulo 20. Producción Animal, Ceniap, INIA, Maracaibo, Venezuela.
- Rubio-Guillén, J.L.; Quintero-Moreno, A.A.; González Villalobos, D. M. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. Universidad de Zulia, Venezuela. *Revista científica*, vol. XIX, número 4, Julio-Agosto 2009, pp. 382-389
- Sandoval, R.M; Santiani, A.A.; Ruiz, L.G.; Leyva, V.V.; Coronado, L.S.; Delgado, A.C. (2007). Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Rev Inv Vet Perú* 2007; 18 (2): 107-114.
- Schuh H. Comparison between liquid and deep-frozen semen for artificial insemination in developing and developed countries. Animal Production and Health Division, FAO.
- Shannon, P. (1978). Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. New Zealand Dairy Board Animal Breeding Centre, Newstead R.D.4, Hamilton, New Zealand. *J.Reprod. Fert* (1978) 54, 519-527.
- Stornelli, M.C.; Tittarrelli, C.M.; Savignone, C.A.; Stornelli, M.A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Cátedra de Reproducción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. *Analecta veterinaria* 2005; 25 (2): 28-35.
- Tonieto, R.A.; Goularte, K.L.; Gastal, G.D.A; Schiavon, R.S.; Deschamps, J.C.; Lucia Jr, T. (2010). Crioprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil. Elsevier, Small ruminant reserach, volumen 93, Octubre 2010, 206:209.
- Torquati, S; Zalazar, P; Cabodevila, J.; Callejas, S. Efecto del método de conservación del semen (refrigerado o congelado) sobre el porcentaje de preñez a la IAFT en vacas tratadas con un dispositivo intravaginal con progesterona. Departamento de Agronomía UNS Bahía Blanca. CIBBIA. Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA, Tandil, Buenos Aires.

- Unal, M.B.; Berndtson, W.E.; Pickett, B.W. (1978). Influence of sugars with glicerol on posth-thaw motility of bovine spermatozoa in straws. Animal Reproduction Laboratory, Department of Physiology and Biophysics, Colorado State University. Journal Dairy Science 1978, 61:83-89.
- Verberckmoes, S. (2004) Preservation of fresh bovine semen and utero-tubal junction insemination in cattle. Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, 2004.
- Vishwanath, R; P. Shannon. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Animal Reproduction Science 62 _2000. 23–53
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 60–61 _2000. 481–492.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5ta Edición.
- Woelders, H.; Matthijs, A.; Engel, B. (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Institute for Animal Science and Health, Lelystad, The Netherlands. Cryobiology 1997 Sep; 35(2):93-105.