



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PARA GRADUADOS
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL CÓRDOBA (IRAC)
ESPECIALIZACIÓN EN REPRODUCCIÓN BOVINA

**EVALUACION DE LA TASA DE PREÑEZ UTILIZANDO DOS
DILUYENTES DE SEMEN EN PROTOCOLOS DE IATF EN VACAS
DE CRIA**

Horacio Robin

Trabajo Final
Para optar al Grado Académico de
Especialista en Reproducción Bovina
Córdoba 2020

AGRADECIMIENTOS

A Agroganadera Griffa S.A. por darme la posibilidad de realizar el trabajo en su establecimiento.

A los Médicos Veterinarios Hector Tarabla y Marcelo Signorini (INTA – CONICET – FCV UNL), por sus aportes en la confección y corrección de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO:

2. RESUMEN	4
3. INTRODUCCION	5
4. OBJETIVOS	8
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	8
5. MATERIALES Y METODOS	9
5.1. ANIMALES Y LUGAR DE TRABAJO	9
5.2. MATERIALES	10
5.3 TRATAMIENTOS	10
5.4 ACONDICIONAMIENTO DE SEMEN.....	11
5.5 RENDIMIENTO DE DOSIS POR EYACULADO	11
5.6 ANALISIS ESTADISTICO	12
6. RESULTADOS	13
6.1 EFECTO DEL TIPO DE DILUYENTE SOBRE LA TASA DE PREÑEZ.....	13
6.2 EFECTO DE LA PRESENCIA DE CELO EN LA TASA DE PREÑEZ	13
6.3 EFECTO DEL NUMERO DE PARTOS SOBRE LA TASA DE PREÑEZ..	14
6.4 EFECTO DEL TERNERO AL PIE SOBRE LA TASA DE PREÑEZ.....	14
6.5 COSTO DEL DILUYENTE POR PAJUELA.....	14
6.6 COSTO DE SEMEN FRESCO Y SEMEN CONGELADO.....	15
7. DISCUSIÓN	16
8. CONCLUSIONES	17
9. BIBLIOGRAFIA	18

2. RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objeto comparar el uso de dos diluyentes de semen: Andromed[®] y leche parcialmente descremada UHT (1,5% de materia grasa), ambos refrigerados por un lapso no mayor a 7 hs, en un programa de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Se utilizaron trescientas cincuenta y tres vacas de cría Limousin con ternero al pie (ciento cuarenta y cuatro vacas) y destetadas (doscientas nueve vacas), distribuidas en 2 campos del mismo propietario en las localidades de Marull y Balnearia en provincia de Córdoba. Los vientres fueron sometidos a un protocolo de IATF que consistió en la aplicación en el Día 0 de un dispositivo intravaginal 0,5 gr (Dib 0,5 gr, Syntex) + 2 mg Benzoato de estradiol (Gonadiol, Syntex) por vía intramuscular profunda. En el Día 8 se retiró el dispositivo y se inyectaron 500 ug d cloprostenol sódico (Ciclase, Syntex), 0,5mg Cipionato de estradiol (Cipiosyn, Sintex) y 400 UI de gonadotropina coriónica equina (Novormon, Syntex), comenzando a inseminarse a las 52 hs pos retiro del dispositivo. Las dosis inseminantes fueron confeccionadas con 35×10^6 espermatozoides extraídas de un mismo toro en dos oportunidades con 3 días de diferencia entre la primera y segunda colección. Los controles de preñez se realizaron por ultrasonografía a los 40 días post IATF.

La tasa de preñez lograda en el estudio fue de la siguiente manera:

Inseminadas con Andromed: 54,9% (90/164)

Inseminadas con Leche: 59,8% (113/189)

Si bien existe una diferencia numérica a favor de la leche descremada, estadísticamente no existen diferencias significativas ($P=0,372$). En conclusión, se demuestra que es indiferente utilizar un diluyente u otro.

Palabras claves: semen fresco – preñez - Andromed[®] - leche.

3. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es la biotecnología de mayor difusión entre los ganaderos del mundo. La misma posee un gran impacto en el avance genético poblacional y un costo reducido (Brogliatti et al., 2012). La creciente necesidad de semen de toros de alta performance genética indujo el desarrollo y perfeccionamiento de las tecnologías de producción y almacenamiento de semen bovino tanto de carne como de leche. En 1980 el número de inseminaciones alrededor del mundo superaba los 130 millones (Bonadonna y Succi, 1980), ya en 1995 el número de dosis producidas en el planeta superaba los 200 millones, siendo el 95 % congelado, excepto en un reducido número de países como Nueva Zelanda, Francia, Holanda, Australia y el este Europeo, donde se utilizaban alrededor de 4 millones de dosis en forma refrigerada o conservadas a temperatura ambiente (Chupin y Tibbien, 1995).

El uso de semen fresco incrementa la producción de dosis, debido a que se evita alrededor del 50% de mortalidad de células que se produce en el congelado (Ramonez, 2013). Durante el uso comercial de semen fresco en países que lo utilizan de forma rutinaria, se conservó durante 3 días, existiendo una caída de la fertilidad a partir de las 48 hs post extracción, encontrándose algunos reproductores que disminuyeron antes (Gerard, 2005).

La criopreservación del semen bovino produce daños irreversibles en las membranas espermáticas, tales como expansión y alteración de las membranas plasmáticas y acrosoma, cambios en el medio osmótico, alteración del mecanismo del calcio y en la actividad enzimática (Woelders et al., 1997; Celeghini et al., 2008). La capacitación espermática, la reacción acrosómica, y la posterior unión de los espermatozoides al ovocito, requieren de una actividad de membrana bioquímicamente activa. Los cambios posteriores a la congelación producen la desestabilización de las membranas espermáticas, proceso que se asemeja a los cambios sufridos en la capacitación fisiológica del esperma. Teniendo en cuenta que los espermatozoides capacitados y/o con su reacción acrosómica desarrollada tienen una menor sobrevivencia (cambios sufridos durante la congelación), esto explica la disminución en la fertilidad del semen congelado (Tartaglione et al., 2004).

El éxito de la inseminación en bovinos, porcinos y ovinos depende grandemente del desarrollo de medios de diluyentes satisfactorios. Los pioneros de la inseminación artificial encontraron que el semen no diluido vivía por un corto periodo de tiempo y que, al

refrigerarlo a 5 grados centígrados, causaba la muerte de la mayoría de los espermatozoides. Así surgieron los extenders o también llamados diluyentes de semen. Estos diluyentes no solo deberían incrementar el volumen del eyaculado, sino también proteger a los espermatozoides durante la refrigeración y congelado en el caso que la hubiera (Gadea, 2003).

Por diluyente se entiende que es la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Carballo, 2009)

El principio de la dilución y refrigeración del semen bovino es proporcionar la sobrevivencia del espermatozoide por periodos prolongados de tiempo (48 a 96 hs; Salisbury y Van Demark, 1961). El mantenimiento refrigerado a 5 °C disminuye la tasa metabólica celular, extendiendo así su supervivencia: avance que se conoció a través del descubrimiento de la yema de huevo y sus propiedades como buffer y protector de las membranas celulares (Phillips, 1939). No obstante, no todos los cambios producto de la disminución de la actividad metabólica son favorables para la célula, por ejemplo, la disminución de la actividad de Na/K⁺, también disminuye a 5°C, decreciendo la difusión de los iones a través de la membrana, aumentando de esta forma la concentración intracelular de Na⁺, hecho que va en detrimento de la vida del espermatozoide (Quinn y White., 1966, 1967; Swueadner y Godin, 1980).

El descubrimiento de nuevos agentes crioprotectores y el avance en el desarrollo de diluyentes, han producido que el uso de semen fresco haya sido gradualmente abandonado, aunque este último presente algunas ventajas sobre el criopreservado (Verberckmoes et al., 2005).

Las propiedades que un buen diluyente debe poseer son (Tribulo et al., 2008):

- Isotónico como el semen
- Debe poseer capacidad buffer (prevenir los cambios de ph)
- Proteger a las células del shock por enfriamiento durante la refrigeración desde la temperatura corporal hasta 5°C (lipoproteínas y lecitinas).
- Proveer nutrientes para el metabolismo celular.
- Controlar la contaminación bacteriana (gentamicina, Tilosina, lincospectina)

- Proteger la célula durante la congelación – descongelación (glicerol).
- Preservar la vida de los espermatozoides con la mínima pérdida de fertilidad.

Las soluciones buffer que conforman la mayor parte del diluyente seminal posee un doble rol: uno es neutralizando el ácido láctico producido por la actividad metabólica de los espermatozoides. El otro es conformando un medio isotónico para el semen.

Los medios para dilución de semen han tenido una evolución continua. Mientras que durante muchos años se recurrió a diluyentes que contenían leche o yema de huevo, en la actualidad la tendencia se orienta a los diluyentes químicamente definidos. Como un paso importante en ésta dirección, se han desarrollados los diluyentes basados en fosfolípidos. Esta novedosa generación de diluyentes está libre de componentes de origen animal, y ya no presentan el peligro de contaminaciones bacterianas. Además, ofrecen por primera vez la posibilidad de una estandarización, lo cual es un paso importante dirigido hacia la garantía de calidad de centros ISO-certificados (Brogliatti et al., 2012).

Diversos ensayos han demostrado la similitud o leve superioridad de diluyentes libres de yema de huevo (AndroMed[®]) frente a referentes estándar con yema de huevo.

La leche entera o descremada puede ser utilizada exitosamente como diluyente seminal (Tribulo et al., 2008). Las micelas de la caseína y la lactosa presente en la leche descremada, son las principales responsables de disminuir los daños por enfriamiento y congelación, ya que secuestran proteínas presentes en el plasma seminal que tras la eyaculación inducen la pérdida del colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas (Almenar, 2017).

La leche posee lacteninas, heteroproteínas antibacterianas en la leche que al ser mezcladas con semen son espermicida, éste efecto adverso se suprime calentándola a 90°C por diez minutos (Tribulo et al., 2008) o utilizar leche UHT (ultra alta temperatura). Lo único que debemos agregar son antibióticos y glicerol en el caso que se vaya a utilizar para congelado. La leche tiene la desventaja de interferir en la visualización del semen en el microscopio, ya que los glóbulos de grasa causan refracción.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la tasa de preñez utilizando semen fresco con dos diluyentes distintos en protocolos de IATF en vacas de cría.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Comparar la tasa de preñez obtenida en programas de IATF utilizando semen fresco con dos diluyentes: Andromed[®] y leche parcialmente descremada UHT.
- Comparar el costo del diluyente por pajuela tanto de semen fresco y congelado.
- Evaluar la tasa de preñez en vacas que manifestaron celo y las que no lo hicieron.

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1 ANIMALES Y LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en dos establecimientos de la provincia de Córdoba, ubicados en las localidades de Marull y Balnearia, próximos a la laguna Mar chiquita. Se utilizaron trescientas cincuenta y tres vacas, con cuarenta y cinco días pos parto en adelante al momento de colocar el dispositivo, distribuidas en 3 lotes. En el lote 1 había doscientas nueve vacas con 6 meses pos parto que habían sido destetadas 3 días antes de colocar los dispositivos, un segundo lote conformado por ochenta y siete vacas con cría al pie, éstos dos primeros ubicados en Balnearia, y un tercer lote conformado por cincuenta y siete vacas puras controladas con cría al pie ubicadas en Marull. (Cuadro 1). Se realizó el trabajo los primeros días del mes de septiembre del año 2019. Los vientres se inseminaron en su totalidad sobre pastoreo de alfalfa diurno utilizando parcelas con rotación periódica y suplementación con silo de sorgo a primera hora de la mañana a razón de 10 kg por vaca, éste régimen de alimentación con suplementación de forraje conservado se realiza de Marzo hasta final del servicio a mediados de Noviembre.

En el cuadro siguiente se detalla el número de vacas que se incluyeron dentro de cada variable.

Cuadro 1. Características de los animales bajo ensayo, Córdoba, 2019.

VARIABLE	CONDICIÓN	N	PORCENTAJE
Ecografía	Vacía	150	42,5%
	Preñada	203	57,5%
	Total	353	100%
Partos	1 parto	296	83,9%
	2 o + partos	57	16,1%
Cría Pie	Sin cría	209	59,2%
	Con cría	144	40,8%
Diluyente	Andromed	164	46,5%
	Leche	189	53,5%
Celo	Con celo	217	61,5%
	Sin celo	136	38,5%

5.2 MATERIALES

Se utilizaron los siguientes elementos y equipos en campo y laboratorio para la extracción de semen y acondicionamiento de pajuelas para inseminar:

- electroeyaculador eporvac, modelo e325.
- Platina térmica nacional.
- Microscopio Motic modelo BE310.
- Cámara de Newbauer (Boeco – Alemania) + cubre cámara.
- Baño maría.
- Diluyente seminal AndroMed[®] (Minitub – Alemania)
- Leche parcialmente descremada UHT.
- Escrotímetro (Reliabull)
- Tubos de ensayo graduados para colecta de semen.
- Tubos falcon de 50 ml.
- Micropipeta y micropuntas de 50 uml.
- Colorante eosina – nigrosina.
- Toallas de papel absorbentes.
- Guantes obstétricos y de latex.
- Pajuelas de 0,5 ml (Minitub)
- Porta y cubreobjetos.

5.3 TRATAMIENTOS

Todos los animales fueron sometidos al mismo protocolo de IATF, que consistió en la aplicación en el Día 0 de un dispositivo intravaginal con progesterona (Dib 0,5 gr, Syntex) + 2 mg Benzoato de estradiol (Gonadiol, Syntex) por vía intramuscular profunda. En el Día 8 se retiró el dispositivo, se pintó la base de la cola para detección de celo (Celo Test, Biotay)

y se inyectaron 500 ug de cloprostenol sódico (Ciclase, Syntex), 0,5mg Cipionato de estradiol (Cipiosyn, Sintex) y 400 UI de gonadotropina coriónica equina (Novormon, Syntex), comenzando a inseminarse a las 52 hs pos retiro del dispositivo.

5.4 CARACTERISTICAS Y ACONDICIONAMIENTO DE SEMEN

Se extrajo semen de un toro Limousin identificado como superior (por sus características fenotípicas) dentro del rodeo, con una circunferencia escrotal de cuarenta y un centímetros.

Se colectó el semen por electroeyaculación en dos días diferentes con un intervalo de 3 días, ya que las vacas estaban sincronizadas en dos grupos.

Se realizó tinción vital (eosina-nigrosina) para el análisis morfológico (Cuadro 2).

Luego de la extracción del semen inmediatamente se llevó a baño maría y se extrajeron muestras con micro pipeta para evaluar motilidad masal (M.M.), motilidad individual progresiva (M.I.P.), realizar dos extendidos con tinción vital y una muestra por cada eyaculado de 50 u/ml para hacer una dilución en 10 ml de agua con el objeto de realizar el conteo de espermatozoides por ml de eyaculado.

En primera instancia, cada eyaculado se dividió en dos y recibió la dilución 1/1 con cada diluyente por separado (AndroMed[®] y Leche descremada), para luego hacer la dilución final en el laboratorio, que se encuentra a 3 km de donde se extrajo el semen.

En todos los casos se utilizaron pajuelas de 0,5 ml de volumen.

5.5 RENDIMIENTO DE DOSIS POR EYACULADO

Primer día de extracción:

- Eyaculado 1: 1110 millones esp./ml x 95% M.I.P.: 1054,4 millones
1054,4 x 5ml de eyaculado: 5272,5 esp. totales.
5272,5/35: 150 pajuelas con 35 millones de esp. cada una.

- Eyaculado 2: 690 millones esp./ml x 95% M.I.P.: 655,5 millones
655,5 x 9 ml de eyaculado: 5899,5 esp. totales.
5899,5 /35: 168 pajuelas con 35 millones de esp. cada una.

Segundo día de extracción:

- Eyaculado 1: 820 millones esp./ml x 95% M.I.P.: 779 millones
779 x 8 ml de eyaculado: 6232 esp. totales.
6232 /35: 178 pajuelas con 35 millones de esp. cada una.
- Eyaculado 2: se descartó porque el requerimiento de semen fue inferior a la cantidad obtenida con el primer eyaculado.

Cuadro 2. Características del semen utilizado en el ensayo

	Primer día de extracción		Segundo día de extracción	
	Eyaculado 1	Eyaculado 2	Eyaculado 1	Eyaculado 2
Volumen	5 ml	9 ml	8 ml	8 ml
Concentración/ml	111 millones	69 millones	820 millones	550 millones
Mot. Masal	MB	MB	MB	MB
M.I.P.	95%	95%	95%	95%
Vigor	4	4	4	4
Morfología				
Normales	93		94	
Cabeza piriforme	1			
Pieza media	4		4	
Cabeza sueltas	2		1	
Cola múltiple			1	

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron estadísticamente mediante el software InfoStat[®] 2008 UNC. Se utilizó regresión logística, donde se evaluaron las variables: tipo de diluyente (AndroMed – leche descremada), categoría (primer parto – dos o más partos), cría al pie y presentación de celo al momento de la IATF.

6. RESULTADOS

Los parámetros analizados no mostraron interacción entre los lotes de vacas entre un campo y otro.

6.1 EFECTO DEL TIPO DE DILUYENTE SOBRE LA TASA DE PREÑEZ

Si bien existe diferencia numérica positiva en la tasa de preñez con el uso del diluyente leche, estos datos demuestran que no existe diferencia estadística significativa con el uso de un diluyente u otro ($P=0,372$; Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del tipo de diluyente en la tasa de preñez

Diluyente	n	% del rodeo	Preñadas	Probabilidad
Andromed	164	46,5%	90	54,9%
Leche	189	53,5%	111	58,7%

6.2 EFECTO DE LA PRESENTACIÓN DE CELO SOBRE LA TASA DE PREÑEZ

Las vacas fueron pintadas en la base de la cola (Celo Test – Biotay) para detectar la presencia o ausencia de celo. Los animales que presentaron celo al momento de la IATF tuvieron una probabilidad de preñarse del 75% y las que no presentaron celo el 55%, existiendo diferencias estadísticas significativas ($P<0,001$; Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la presentación de celo sobre la tasa de preñez.

	n	% del rodeo	Preñadas	Probabilidad
Con celo	217	61,5%	163	75%
Sin celo	136	38,5%	75	55%

6.3 EFECTO DEL NÚMERO DE PARTOS SOBRE LA TASA DE PREÑEZ

Los datos demuestran que las vacas de un parto tuvieron una probabilidad de preñarse del 51% y las vacas de dos o más partos el 78%, existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0,003$; Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del número de partos sobre la tasa de preñez.

Partos	n	% del rodeo	Preñadas	Probabilidad
1 parto	296	83,9	151	51%
2 o + partos	57	16,1	44	78%

6.4 EFECTO DEL TERNERO AL PIE SOBRE LA TASA DE PREÑEZ

Los datos demuestran que no existe diferencia estadística significativa en los animales que tenían cría al pie y las que no lo tenían. (Cuadro 6)

Cuadro 6. Efecto de la presencia del ternero al pie sobre la tasa de preñez

	n	% del rodeo	Preñadas	Probabilidad
Sin cría al pie	209	59,2	134	64%
Con cría al pie	144	40,8	96	67%

6.5 COSTO DEL DILUYENTE POR PAJUELA

El costo del diluyente Andromed[®] preparado con agua bidestilada es de \$4,47 (con un dólar a \$65), existiendo una diferencia con leche descremada UHT de \$4,42 por pajuela al preparar 2000 dosis de 0,5 ml de volumen. Esta es una de las razones por la cual se utiliza en algunos centros de confección de semen, ya que la gran cantidad que se realiza hace que baje considerablemente el costo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Costo del diluyente por dosis de 0,5 ml de volumen

Diluyente	Costo/litro de diluyente	Costo por dosis 0,5 ml
Andromed [®]	U\$u 110	\$4,47
Leche descremada UHT	U\$u 1,4	\$0,045

6.6 COSTO DE SEMEN FRESCO Y SEMEN CONGELADO

El costo de preparación (mano de obra y materiales) de semen fresco se cotiza (1kg de novillo Liniers) en el mercado actual \$80 por pajueta, en el caso de que se tenga que sumar el proceso de congelado \$160 (2 kg de novillo Liniers) y el precio al público, que incluye el valor genético del animal, vendido por las firmas dedicadas a éste rubro en el país, se cotiza (4 kg de novillo Liniers) actualmente en \$320 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valor por pajueta de semen fresco y congelado

Tipo de conservación	Costo por pajueta	Precio de venta al público
Fresco	\$80	\$160
Congelado	\$160	\$320

7. DISCUSIÓN

Este trabajo fue diseñado con el objeto de comparar el comportamiento de dos diluyentes de semen y evaluar su eficacia en la tasa de preñez.

Los resultados obtenidos del análisis no mostraron diferencia significativa en tipo de diluyente (Andromed y leche descremada UHT), si bien no se encontró un trabajo en el cual se comparen éstos dos diluyentes solamente, si existen otras publicaciones (Carpio Chuchuca S. V., 2015; Muiño R. et al., 2009) que comparan diversos diluyentes entre sí, donde demuestran resultados diferentes para algunos parámetros de calidad seminal (como motilidad individual progresiva, vivo/muertos, integridad de acrosoma, vigor, entre otros) pos descongelado pero no realizaron ensayos para evaluar la tasa de preñez.

No se encontraron diferencia para vacas con o sin cría al pie, si bien éste parámetro no coincide con la literatura que describe ampliamente los resultados positivos en la ciclicidad ovárica (Bellows et al., 1974; Houghton et al., 1990) y la tasa de preñez (Arias et. al., 1999; Schiersman et al., 1991) cuando las vacas son destetadas, atribuyo éste resultado a que estos animales en su mayoría eran de primer parto y habían tenido su primer servicio con edad temprana, por lo tanto, se vio afectado su desempeño reproductivo al primer servicio luego del parto por la falta completa de su desarrollo corporal. A diferencia de las vacas multíparas que dieron diferencia en la tasa de preñez. También se encontraron diferencia significativa para presentación de celo al momento de la IATF, este dato concuerda con la bibliografía (Sa Filho et al. 2011), que describe la mayor concepción en aquellos animales que presentan estro.

El costo de utilización de usar semen fresco se reduce comparado con el semen congelado, de igual manera el costo es menor al utilizar el diluyente leche comparado con AndroMed[®], ésta última ventaja es de interés cuando se confeccionan grandes cantidades de pajuelas, como en centros de inseminación, que cada vez más optan por éste extender.

8. CONCLUSIÓN

Ambos diluyentes demostraron ser eficientes para su uso rutinario con semen fresco, teniendo la ventaja que la leche descremada UHT es de adquisición sencilla y económica, aunque presenta la dificultad de la observación al microscopio.

9. BIBLIOGRAFIA

a) Artículos en revistas científicas:

- Bellow, R.A., Short, R.E., Urick, J.J., Pahnish, O. F., 1974. Effects of early weaning on postpartum reproduction of the dam and growth of calves born as multiple singles. *Anim. Sci.* 39:589-595.
- Carpio Chuchuca S. V., 2015. Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada. Tesis de grado.
- Celeghini E.C.C., Arruda R.P., Andrade A.F.C., Nascimento J., Raphael C.F., Rodrigues P.H.M., 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*; 104:119–31.
- Chupin, D., Thibier M., 1995. Survey of the present status of the use of artificial insemination in developed countries. *World Anim.* 82,58-68.
- Gadea, J., 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine: Review. *Span. J. Agric. Res.* 2.17-28.
- Houghton, P. I., Lemenager, R.P., Horstman, I. A., Hendrix, K. S., Moss, G. E., 1990. Effects of bodycomposition, pre and postpartum energy level and early reproductive performance of beef cows and preweaning calf gain, *J. Anim. Sei.* 68: 1438-1448.
- Quinn, P.J., White, I.G., 1966. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 12,263.
- Quinn, P.J., White, I.G., 1967. Active cation transport in dog spermatozoa. *Biochem. J.* 104,328.
- Gerard, O., 2005. Le insemination en semence réfrigérée chez les bovins. *BTTia*, n° 116, junio 2005, pp13-17.
- Sa Filho M.F., Santos J.E.P., Ferreira R.M., Sales J.N.S., Baruselli P.S., 2011. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled bos indicus cows submitted to estradiol/progesterone based timed insemination protocols. *Theriogenology* 76, 455-463.
- Schiersmann, G. C. S., Mihura, H., Callejas, S. S., Alberio, R. H., 1991. Efecto de un destete definitivo antes del Segundo servicio en primavera sobre el comportamiento reproductivo de vacas primiparas paridas en otoño. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 11:167-175.
- Verberckmoes S., Soom A.V., Dewulf J., Kruif A., 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology* 2005; 63:912–22.

b) Capítulos de libros

- Arias, M., Soni, C. A., Stahringer, R. C., Sampedro, D. Y., Slobodzian, A., 1999. Optimizando la eficiencia biológica en la reproducción. *Jornada ganadera del NEA*, PP. 41-71.

- Bonadonna, T., Succi, G.W., 1980. Artificial insemination in the world. Proc.9th Int. Congr. Anim. Artif. Insem. Madrid, Spain, vol.5, pp. 655-657.

- Brogliatti G.M., S.F. Avances con el uso de diluyentes libres de yema de huevo en la congelación de semen bovino. Especialidad en reproducción bovina. Curso congelado de semen bovino. Anexo. pp 87.

- Brogliatti, G.M., García Miglaro F., Laramburu G. Tríbulo H., 2012. Aplicaciones del análisis computarizado de semen (CASA) en la evaluación de la calidad seminal y la fertilidad. Especialidad en Reproducción Bovina. Curso congelado de semen. Anexo. pp 37.

- Salisbury, G. W., VanDemark, N.L., 1961. Diluents and extension and extension of semen. In: Salisbury, G.W., Van Denmark, N.L. (Eds.), Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of cattle. Freeman, San Francisco, pp. 412-435.

- Schiersmann, G. C. S., Mihura, H., Callejas, S. S., Alberio, R. H., 1991. Efecto de un destete definitivo antes del Segundo servicio en primavera sobre el comportamiento reproductivo de vacas primiparas paridas en otoño. Rev. Arg. Prod. Anim. 11:167-175.

- Sweadner, K.J., Goldin, S.M., 1980. Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function and regulation. N. Engl. J. Med. 302, 777-783.

- Tartaglione, C.M., Ritta, M.N., 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. Theriogenology 62, 1245-1252.

- Tribulo H., Tribulo R., Barth A., Bó G., Carcedo J., Brogliatti G., 2008. Evaluación de toros y calidad seminal. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. Pag.: 99 – 100.

c) Internet

- Almenar, C., 2017. Nuevos protocolos para la criopreservación de espermatozoides macho cabrio. Publicado en internet, disponible en: http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12583/tesismaster_CristinaTomas.pdf sequence=1

- Carballo, D. M., 2009. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovinos bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. Publicado en internet, disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/65/1/DanielMCarballoGuerrero.pdf>

- Ramonez J. C., 2013. Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Tryladil) en la congelación de semen bovino. Publicado en internet, disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ac/bitstream/123456789/4535/1/Tesis.pdf>

d) Trabajo de jornada o congresos:

- Muíño, R., Peña A.I., 2009. Estudio comparativo de tres diluyentes: Andromed, Biociphos plus y Biladil. Evaluación de la supervivencia y longevidad espermática pos descongelacion de espermatozoides bovinos. XIII Jornadas sobre producción animal . Zaragoza. 12 y 13 de Mayo de 2009.

ANEXO:

En las siguientes tablas están las estimaciones del porcentaje de vacas que quedaron preñadas en cada nivel de la variable. Es posible que estos porcentajes no coincidan con los valores calculados exclusivamente para cada parámetro (ya sea número de partos, cría al pie, diluyente y celo) ya que esto es el efecto de la variable habiendo corregido el efecto de todas las variables que potencialmente influyen sobre la preñez y que se incluyen en el análisis.

Medias marginales estimadas: Partos

Estimaciones

Partos	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
1 parto	,51	,034	,45	,58
2 o + partos	,78	,062	,63	,88

Medias marginales estimadas: Cría Pie

Estimaciones

Cría_Pie	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
Sin cría	,64	,056	,53	,74
Con cría	,67	,044	,58	,75

Medias marginales estimadas: Diluyente

Estimaciones

Diluyente	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
Andromed	,63	,049	,53	,72
Leche	,68	,047	,58	,76

Medias marginales estimadas: Celo

Estimaciones

Celo	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
Con celo	,75	,039	,66	,82
Sin celo	,55	,054	,45	,66