



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**CALIDAD Y CAPACIDAD FERTILIZANTE IN VITRO DE SEMEN DE  
TOROS CRIOLLO URUGUAYO CRIOPRESERVADO EN DOS  
DILUYENTES COMERCIALES Y ANÁLISIS DE VARIABILIDAD  
GENÉTICA**

**Yael Filipiak Neumark**

**TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**URUGUAY**

**2021**



# UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

## FACULTAD DE VETERINARIA

### Programa de Posgrados

#### CALIDAD Y CAPACIDAD FERTILIZANTE IN VITRO DE SEMEN DE TOROS CRIOLLO URUGUAYO CRIOPRESERVADO EN DOS DILUYENTES COMERCIALES Y ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Yael Filipiak Neumark

---

**Dra. Silvia Llambí**

**Directora de Tesis**

---

**Dra. Eileen Armstrong,**

**Co-directora**

---

**Dr. Danilo Fila**

**Co-director**

---

**Dr. Rafael Aragunde**

**Co-director**

2021



**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE  
DEFENSA DE TESIS**

**Nicolás Cazales; MSc, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República - Uruguay**

**Rosa Gagliardi; MSc, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República - Uruguay**

**Julia Giriboni; MSc, PhD  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República - Uruguay**



**Unidad de Posgrados  
-Oficina de Posgrados-**

---

**FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

Calidad y capacidad fertilizante in vitro de semen de toros Criollo Uruguayo criopreservado en dos diluyentes comerciales y análisis de variabilidad genética

Por: **DMTV. Yael FILIPIAK NEUMARK**

**Directora de Tesis:** Dra. Silvia Llambí  
**Codirectores de Tesis:** Dra. Eileen Armstrong  
Dr. Danilo Fila  
Dr. Rafael Aragunde

**Tribunal**

**Presidente:** Dr. Nicolás Cazales

**Segundo Miembro:** Dra. Rosa Gagliardi

**Tercer Miembro:** Dra. Julia Giriboni

**FALLO DEL TRIBUNAL: Aprobada con Mención**

**Montevideo, 6 de mayo de 2021**

El Fallo del Tribunal puede ser: Aprobada (corresponde a la nota 6- BBB) o Aprobada con Mención (corresponde a la nota 12-SSS)



## ACTA DE EXAMEN

**CURSO:** Defensa de Tesis de Maestría

**LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA:** Sala Virtual de Plataforma Zoom, Facultad de Veterinaria, UdelaR, jueves 6 de mayo de 2021

**Tribunal:** Dr. Nicolás Cazales (presidente), Dra. Rosa Gagliardi, Dra. Julia Giriboni

C.I. ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
1783571-5	FILIPIAK NEUMARK, Yael	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

### TRIBUNAL

Dr. Nicolás Cazales

### FIRMA

Dra. Rosa Gagliardi

Dra. Julia Giriboni

## **DEDICATORIA**

A mis hijos y esposo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre.

A mi Facultad de Veterinaria, tutores y amigos.

A Dios por darme vida y permitirme llegar a este momento...



## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1. Antecedentes.....	7
1.2. Bovinos criollos .....	8
1.3. Reproducción del BC.....	9
1.4. Banco de semen de BCU .....	10
1.5. Criopreservación del semen y diluyentes .....	11
1.6. Evaluación de la calidad del semen .....	13
1.7. Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) .....	14
1.8. SNPs y fertilidad.....	15
2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA .....	20
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS .....	21
4.1. Objetivo general .....	21
4.2. Objetivos Específicos .....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
5.1. Lugar tiempo y animales .....	22
5.2. Estrategia de investigación .....	22
5.3. Colecta y criopreservación del semen .....	23
5.4. Experimento 1: Evaluación de la calidad del semen de 8 toros congelado con 2 diluyentes comerciales (Andromed® y Triladyl®).....	24
5.5. Experimento 2: Evaluación de la fertilidad <i>in vitro</i> del semen de 4 toros congelado en dos diluyentes comerciales .....	25
5.6. Experimento 3: Evaluación de marcadores moleculares de ADN (SNPs) asociados a la fertilidad en bovinos .....	26
5.7. Análisis estadístico .....	26
6. RESULTADOS.....	28
6.1. Experimento 1: Estudio del semen (CASA).....	28
6.2. Experimento 2: Fertilización <i>in vitro</i> .....	35
6.3. Experimento 3: SNP .....	36
7. DISCUSIÓN .....	40
8. CONCLUSIONES .....	45
9. CONSIDERACIONES FINALES .....	45
10. RECONOCIMIENTOS.....	46
11. LITERATURA CITADA.....	47
12. ANEXOS.....	56

## RESUMEN

La Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay) cuenta con un banco de semen de unas 800 pajuelas de bovinos Criollo Uruguayo (BCU) de la reserva de San Miguel (~600 animales) congelado en dos diluyentes comerciales, Andromed® (A) sin yema de huevo y Triladyl® (T) con yema de huevo. El objetivo de esta tesis fue conocer la calidad y capacidad fecundante *in vitro* (FIV) del semen contenido en el banco y estudiar marcadores moleculares tipo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Se realizaron 3 experimentos: Experimento 1: Semen congelado de 8 toros, diluido en T y A (16 muestras) fueron evaluados por sistema computarizado (CASA) inmediatamente post-descongelado: concentración, motilidad, cinética, morfología y se realizó test hiposmótico, repitiéndose motilidad y cinética a las 2h post-descongelado. Se aplicó el test-T para tiempo y diluyentes y percentiles para categorizar las 16 muestras. Experimento 2: 404 complejos ovocito-células del cúmulo (COC) calidad A, obtenidos de ovarios bovinos de frigorífico, fueron madurados en TCM-199 adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y hormonas, en gotas cubiertas con aceite mineral a 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad saturada; tras 22h en incubadora los COC se inseminaron con semen de 4 toros diluido en A y T, seleccionado por centrifugación en gradientes de Percoll® (90/45%) en Talp-Sperm. Se formaron gotas con Talp-Fert con 2x10<sup>6</sup>spz/ml y se colocaron los COC en cocultivo por 18h. Los presuntos cigotos se denudaron y cultivaron en medio CR1aa con SFB (5%). Se evaluó clivaje (48h) y desarrollo embrionario (DE) al día 7. Los resultados de la FIV se analizaron mediante Chi-cuadrado. Experimento 3: consistió en el análisis de frecuencias de SNP, localizados en genes (*IGF1*, *IGF1R*, *SEPT12*, *CCT6A*, *7SK*, *HS6ST2*, *SFMBT1*, *SOX5*) relacionados con fertilidad en los 26 toros de la reserva. El genotipado se realizó mediante análisis automatizado (Axiom™ Bovine Genotyping v3 Array), de muestras de ADN obtenidas a partir de folículo piloso. Las muestras de semen estudiadas presentan una calidad espermática cuestionable, dados sus valores de motilidad progresiva (MP), solo 10 de las 16 muestras, contienen una dosis inseminante adecuada, con resultados similares de motilidad y HOST para ambos diluyentes (A y T). Uno de los toros presentó exceso en anomalías espermáticas. No hubo diferencias significativas en el clivaje ni en el DE entre diluyentes. Se encontraron diferencias significativas en clivaje solamente entre dos de los toros (p=0.008) pero no entre ellos respecto a los otros dos toros. No hubo diferencias significativas en DE. En la población estudiada (26 toros) se identificaron 26 polimorfismos tipo SNPs en 6 genes vinculados a fertilidad (*IGF1R*, *SEPT12*, *CCT6A*, *HS6ST2*, *SFMBT1* y *SOX5*) de los cuales el 54% resultaron fijados, esto podría deberse a que nos encontramos con una población cerrada desde el punto de vista genético con características raciales propias. El semen estudiado podría ser utilizado para inseminación artificial u otras biotecnologías reproductivas (no comercialmente) en el

marco de los esfuerzos conservacionales de la raza, salvo el semen de uno de los toros, que presentó problemas graves en la morfología espermática.

**Palabras clave:** Bovino Criollo Uruguayo, Fertilización *in vitro*, características seminales, CASA, banco de semen, SNP

## ABSTRACT

The Veterinary Faculty (University of the Republic, Uruguay) has got a semen bank of about 800 straws of Uruguayan Criollo cattle from the San Miguel reserve (~ 600 animals) frozen in two commercial diluents, Andromed® (A) without egg yolk and Triladyl® (T) with egg yolk. The objective of the thesis was to evaluate the quality and *in vitro* fertility (IVF) of the semen contained in the bank and to study molecular markers like single nucleotide polymorphism (SNP) in the bull's population. 3 experiments were performed: Experiment 1: semen from 8 bulls, diluted in T and A was evaluated by computerized system (CASA): concentration, motility, kinetics, morphology and was performed a hypo osmotic swelling test. After 2h motility and kinetics were repeated. T-test for time and diluents was applied and percentiles to categorize the 16 groups. Experiment 2: 404 A-quality oocyte-cumulus complexes (OCC) obtained from bovine ovaries from a slaughterhouse, were matured in TCM with 5% BCS and hormones, in drops covered with mineral oil, at 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> and saturated humidity. After 22h were inseminated with selected semen of 4 bulls in A and T, which was selected by centrifugation in Percoll® gradients (90/45%) in Talp-Sperm and adjusted with Talp-Fert to 2x10<sup>6</sup> sperm/ml, drops covered with mineral oil were formed and placed the OCC inside and were cocultured for 18h. The presumed zygotes were denuded and cultured in CR1aa with BCS (5%). The cleavage (48h) and embryo development (ED) on day 7 (IETS standards) were evaluated. Results were analyzed by Chi square. Experiment 3: consisted of the evaluation of DNA markers related to fertility of 26 bulls, based on their location within the candidate genes *IGF1*, *IGFR1*, *SEPT12*, *CCT6A*, *7SK*, *HS6ST2*, *SFMBT1*, *SOX5*. Genotyping was performed from isolated DNA from hair follicles by automated analysis (Axiom™ Bovine Genotyping v3 Array), from DNA obtained from hair follicle. The studied samples show questionable sperm quality, given their progressive motility values, only 10 of the 16 samples contain an adequate inseminating dose, with similar motility and HOST results for both diluents (A and T). One of the bulls had excess of sperm abnormalities. There were no significant differences in cleavage or ED between diluents. Significant differences in cleavage were found only between two of the bulls ( $p = 0.008$ ) but not between them with respect to the other two bulls. There were no significant differences in ED. In the population studied (26 bulls) 26 SNPs type polymorphisms were identified in 6 genes linked to fertility (*IGF1R*, *SEPT12*, *CCT6A*, *HS6ST2*, *SFMBT1* and *SOX5*) of which 54% were fixed, this could be due to the fact that it is a closed population with its own racial characteristics. The semen could be used in artificial insemination or other reproductive biotechnologies (not commercially) in order to the breed's conservation efforts, except the semen samples from one of the bulls, which presented serious problems in sperm morphology.

**Key words:** Uruguayan Creole Cattle, *In vitro* fertilization, seminal characteristics CASA, semen bank, SNP.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes

La Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay) cuenta con un banco de semen de unas 800 pajuelas, de 12 toros Criollo Uruguayo (BCU), de la reserva de San Miguel (~600 animales), congelado en dos diluyentes comerciales, Andromed® (A) sin yema de huevo y Triladyl® (T) con yema de huevo.

Es importante conocer la calidad del semen contenido en el banco, en cuanto a sus características y fertilidad, ya que será utilizado para inseminación artificial (IA) y producción de embriones y constituye una reserva de material genético de una raza considerada en riesgo de extinción frente a una eventual epidemia o catástrofe.

La fertilidad de un toro se entiende como la capacidad de preñar a las vacas. La fertilidad de los toros se vincula a múltiples factores. En poblaciones no seleccionadas hasta un 40 % de los toros podrían ser subfértiles e incluso algunos estériles. En los grupos de cría, los toros más fértiles suelen enmascarar a los toros subfértiles (Kastelik y Thundathil, 2008).

El CASA es un sistema automatizado de alta eficiencia para el análisis computarizado de semen que cuantifica en forma objetiva los principales parámetros de la calidad y funcionalidad espermática, evaluando e identificando a cada espermatozoide individualmente y a la población en general (Amann y Waberski, 2014; Valverde, 2018).

En la actualidad además de analizar las características del semen, se evalúa su comportamiento mediante la fertilización *in vitro* (FIV) ya que los resultados obtenidos *in vitro* podrían considerarse predictivos de la fertilidad de los bovinos (Amann y Gill, 2000; Rodríguez-Martínez, 2003). Dado que no hay antecedentes del uso de semen de BCU en la FIV, hace que este trabajo sea novedoso, además del aporte al conocimiento y que constituya un paso más hacia la conservación de esta raza y un acercamiento a la aplicación de biotecnologías que pueden ser utilizadas próximamente como herramientas para su conservación.

La futura ampliación del banco y la incorporación al mismo de embriones y tejidos, exige conocer la calidad del semen de los toros BCU de la reserva. También es de utilidad determinar el efecto de distintos diluyentes de semen en los parámetros de semen y en la FIV del ganado BCU. Hasta el momento, no se han hecho estudios de FIV en BCU, tampoco encontramos en la literatura que se compare el efecto de los diluyentes en la fertilidad *in vitro* en ninguna raza bovina, por lo cual se considera de interés adicional esta propuesta.

Por otro lado, resulta de interés conocer aspectos genéticos de la totalidad de los toros de la reserva (26 toros) los cuales son progenitores y propagadores de genes para las próximas generaciones de BCU y a su vez conocer la variabilidad genética para genes vinculados a la reproducción, los cuales hasta el momento no han sido estudiados en BCU, es un aporte al conocimiento de esta raza.

Buscamos mediante esta tesis determinar valores de calidad y capacidad fertilizante in vitro de semen de BCU criopreservado en dos diluyentes comerciales, así como realizar análisis de frecuencias de SNPs, localizados en genes relacionados con fertilidad en los 26 toros de la reserva.

## **1.2. Bovinos criollos**

El bovino Criollo (BC) existe en el continente americano introducido por conquistadores europeos desde los siglos XVI y XVII. Se caracteriza por su gran rusticidad en cuanto a su adaptación a las condiciones ambientales y de manejo donde las razas seleccionadas no son eficientes, su elevada fertilidad, su baja incidencia en partos distócicos, su habilidad materna, las mucosas pigmentadas que los favorecen frente a los rayos solares, resistencia a parásitos y diversos patógenos (Rodríguez *et al.*, 2001; Armstrong y Postiglioni, 2010). Estas características hacen que se desee conservar este potencial y evaluar su posible introducción a sistemas productivos sustentables, ya sea de la raza pura o sus cruza lo que aportaría grandes ventajas a la producción bovina.

El Bovino Criollo Uruguayo (BCU) ha persistido en nuestro país gracias a la reserva existente en el Parque Nacional de San Miguel (coordenadas: 33°42'S 53°33'O) perteneciente al Servicio de Parques del Ejército (SEPAE, Ministerio de Defensa). A pesar de existir otros establecimientos que tienen ganado criollo, ésta es la única reserva genética de nuestro país, y si bien se presume que pudo haber ingresado en algún momento genética de razas bovinas comerciales, la población se ha mantenido en aislamiento reproductivo, lo cual hace que se asemejen a las diferentes razas criollas latinoamericanas y se diferencien de las razas comerciales (Llambí y Armstrong, 2016). En esta reserva hay aproximadamente 600 animales, los cuales reciben un manejo mínimo, limitado a desparasitaciones periódicas y vacunaciones exigidas por el MGAP. Sin embargo, estos animales están concentrados en un mismo lugar, lo que supone un riesgo muy alto de extinción en el caso de emergencia sanitaria o ambiental.

Existen además pequeñas poblaciones de criollos con diferentes grados de pureza en otras partes del país. En la década de 1960 algunos animales de Rocha fueron destinados a

producciones bovinas en Cerro Largo y Rivera con el fin de realizar cruzamientos con razas Aberdeen Angus, Hereford, Caracú y cebuinas, para obtener animales resistentes de condiciones ambientales extremas, parásitos, etc. Esto dio origen a dos nuevas poblaciones con introgresión de Criollo: una en Cerro Largo y otra en Rivera (Armstrong *et al.*, 2011; Llambí y Armstrong, 2016).

La raza Criollo Uruguayo, en el año 2019 ingresó al libro de registros genealógicos de la Asociación Rural del Uruguay (ARU), a partir de los ejemplares que cuenta la reserva y otros animales criados en predios privados, con el objetivo de preservar la pureza racial y sus características genéticas en cuanto a rusticidad y tipo de carne producida (Asociación Rural del Uruguay, 2019).

### **1.3. Reproducción del BC**

Es sabido que la raza de los animales es un factor de variación de la performance reproductiva. Tanto los parámetros del semen como su fertilidad *in-vitro* (FIV) podrían verse afectados por la raza del animal. Como ejemplo de esto, embriones obtenidos de *Bos indicus* y sus cruzas presentan menor mortalidad embrionaria y mayor porcentaje de preñez que *Bos taurus* tras ser implantados en receptoras cruza (Arreseigor *et al.*, 2016a; Arreseigor *et al.*, 2016b). No encontramos sin embargo estudios que comparen a los BCU respecto razas comerciales en este aspecto. En general se concibe al ganado criollo latinoamericano como sobresaliente en fertilidad, habilidad materna y longevidad y se considera a los toros como sexualmente más activos que los de razas comerciales (Primo, 1992).

Quezada *et al.* (2012 a 2016) han estudiado el comportamiento reproductivo de BC de México desde distintas perspectivas: Ciclo estral, (Quezada *et al.*, 2013; Quezada *et al.*, 2014) estro y sincronización (Quezada *et al.*, 2013; Quezada *et al.*, 2015; Quezada *et al.*, 2016a) y tiempo a la inseminación artificial (IA) (Quezada *et al.*, 2012). Entre las principales diferencias encontradas con respecto a las razas comerciales notaron un alargamiento del tiempo entre el estro y el pico de LH, lo cual implicaría una diferencia importante a tener en cuenta para la inseminación artificial (IA).

Valverde y Madrigal (2018) estudiaron durante dos años consecutivos la pubertad en vaquillonas criollas (México) respecto a razas británicas (cruzas de Hereford y Aberdeen Angus) y observaron que las hembras criollas presentaban mayor concentración de progesterona sérica y una tendencia a alcanzar la pubertad antes que las británicas.



Quezada *et al.* (2016b) estudiaron el efecto de las estaciones sobre los parámetros reproductivos de toros Criollos Corriente (México) respecto a razas europeas, evaluando semen, circunferencia escrotal (CE) y concentración de testosterona durante 4 años. La CE fue menor en los BC que en las razas europeas en todas las estaciones. La concentración de testosterona fue mayor en BC durante el verano y otoño respecto a los bovinos de origen europeo. En cuanto a las características del semen encontraron que la estación no provocó cambios en los BC, mientras que las razas europeas tuvieron menor calidad de semen durante el verano mexicano. Esto indica una mejor adaptación de los BC a las condiciones ambientales, concluyendo que son animales que pueden ser utilizados para reproducción durante todo el año aún en condiciones de estrés térmico.

Boggio Devincenzi *et al.* (2019) en un estudio realizado en 18 toros BCU de distintas edades, concluyeron que el 100% fue apto para la reproducción y que 100% de los toros tuvo tono testicular firme y elástico un día después de haber estado en servicio.

#### **1.4. Banco de semen de BCU**

La Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay) cuenta con un banco de semen de unas 800 pajuelas de 12 toros BCU de la reserva de San Miguel (~600 animales) congelado en dos diluyentes comerciales (Andromed®, sin yema de huevo y Triladyl®, con yema de huevo).

La creación de un banco de material genético (semen, pero en un futuro óvulos y embriones criopreservados) constituye una herramienta *ex situ* para conservación a largo plazo y protección de la raza (Llambí y Armstrong, 2016) esto permitiría además aumentar las posibilidades de manejo de las poblaciones y su recuperación en caso que fuera necesario (FAO, 2012). También es mucho más sencillo transferir muestras criopreservadas (semen y/o embriones) de una localidad a otra que animales en pie.

Se proyecta la formación de un banco de germoplasma, completando las muestras de semen con la totalidad de los toros existentes en la reserva (26 animales) además de mantener ovocitos y embriones criopreservados con el fin de expandir la raza y/o ser utilizados en caso de necesidad.

Es importante conocer la calidad del semen conservado en el banco en cuanto a sus características y fertilidad, ya que será utilizado para IA y producción de embriones y constituye una reserva de material genético de una raza considerada en riesgo de extinción frente a una eventual epidemia o catástrofe.

## 1.5. Criopreservación del semen y diluyentes

Uno de los factores que influyen en la fertilidad *in vitro* e *in vivo* es la calidad de semen, la cual depende de la capacidad reproductiva del macho, el manejo del semen luego de obtenido y los métodos de criopreservación y descongelación (Lozano, 2009).

El semen criopreservado suele presentar cambios que interfieren en los procesos de capacitación, produciendo una capacitación prematura (Cormier *et al.*, 1997) lo cual reduce la fertilidad del semen (Watson, 1995).

Para que los espermatozoides criopreservados mantengan su potencial fertilizante, deben mantener la integridad y funcionalidad de las estructuras que lo componen, son de especial importancia el metabolismo para la producción de energía, la MP, las enzimas acrosómicas (que permiten la penetración al ovocito) y la integridad de la membrana plasmática y sus proteínas que ayudan a mantener la vitalidad durante su llegada al ovocito y su posterior unión a la membrana plasmática (Andrabi, 2009; Trimeche, *et al.*, 1999; Salomon y Maxwell, 1995; Hummersted *et al.*, 1990).

La congelación de semen utiliza diluyentes, que además de aumentar el volumen del eyaculado para obtener mayor número de dosis, están provistos de crioprotectores y otras sustancias que preservan a los espermatozoides durante el enfriamiento, la congelación y descongelación, amortiguando los efectos producidos por los cambios de temperatura al que son sometidos (referencias).

Los diluyentes comerciales difieren entre sí, especialmente en que a algunos se les adiciona yema de huevo la cual contiene lipoproteínas de baja densidad (LDL), que contribuyen con factores que actúan como crioprotectores de los espermatozoides al descenso de temperatura, contra el shock de frío (factor de resistencia) y un segundo factor (factor de conservación) que mantiene su viabilidad, uno de estos factores es la fosfatidilcolina (lecitina) (García Vera, 2014; Watson, 1995; Fiser y Fairfull, 1986).

Una desventaja importante que tienen los diluyentes con yema de huevo es que son difíciles de estandarizar por su variable composición, además de presentar riesgos de contaminación bacteriana, micoplasmas y/o hormonas o residuos farmacológicos (Minitube, 2018a; Van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2000; Aires *et al.*, 2003). Por otro lado, pueden surgir dificultades para su comercialización a nivel internacional al tratarse de un producto de origen animal.

Estos inconvenientes han propiciado el uso de diluyentes libres de elementos de origen animal, sustituyendo la yema de huevo por lecitina de soja (Aires *et al.*, 2003). La lecitina de soja tiene un efecto crioprotector por su baja viscosidad, al tiempo que tiene menos residuos (Van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 2000) y un alto contenido de fosfolípidos del mismo modo que la yema de huevo (Fukui *et al.*, 2008).

Estos compuestos han resultado además beneficiosos por su facilidad de procesamiento y preparación, con buenos resultados en cuanto a motilidad progresiva (MP) y vitalidad espermática post-descongelamiento (Galarza, 2013) y presentan menos inconvenientes en su comercialización al no contener productos de origen animal.

A continuación, se describen los diluyentes comerciales con y sin yema de huevo (A y T) que han sido utilizados para congelar el semen del banco.

#### **AndroMed® (Minitube International A.G., Germany)**

Es un diluyente comercial preparado con lecitina de soja y libre de ingredientes de origen animal (lo cual previene el riesgo de contaminación microbiológica, hormonal y/o residuos farmacológicos). Presenta una fórmula estable y optimizada, apta para ser usada en semen de bovinos, ovinos o caprinos. AndroMed® contiene fosfolípidos, Hidroxi-MetilAminometano (TRIS), ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, sustancias *buffer*, glicerol y agua ultrapurificada. La versión *standard* contiene antibióticos (Tylosina, Gentamicina, Espectinomycina, Lincomicina), también se produce una versión sin antibióticos (AndroMed® CSS) (Minitube, 2018a, Mendoza *et al.*, 2000; Woelders, 1997; Ansari *et al.*, 2011).

Su preparación es sencilla agregando agua destilada al contenido de un frasco del líquido concentrado AndroMed® (200ml). Además de estas ventajas, AndroMed® es semitransparente lo cual facilita la observación de los espermatozoides al microscopio.

#### **Triladyl® (Minitube International A.G., Germany)**

Este diluyente es un concentrado basado en TRIS que cumple la función de ser un amortiguador sintético. Contiene TRIS, ácido cítrico, azúcares, sustancias *buffer*, glicerol, agua ultrapurificada y antibióticos (Tylosina, Gentamicina, Espectinomycina, Lincomicina). También se produce una versión sin antibióticos (Triladyl® CSS) (Minitube, 2018b; Fukui *et al.*, 2008).

Se prepara agregando a una parte del concentrado líquido tres partes de agua destilada, una parte de yema de huevo (20%).

Varios autores han estudiado el efecto de distintos diluyentes (comerciales y no comerciales) en la calidad del semen en bovinos y ovinos con resultados variables (Carballo *et al.*, 2009; Nuñez y Rubio, 2015; Aguilar *et al.*, 2013; Thun *et al.*, 2002; Galarza, 2013; Rehman, 2012). Un estudio realizado en bovinos criollo en los Andes ecuatorianos (Argudo *et al.*, 2019) evaluaron distintos métodos de obtención y congelación de semen utilizando T y A y estudiaron las características seminales con el sistema CASA, sin embargo, hay pocos antecedentes en bovinos criollos en lo que respecta a su comportamiento en la fertilización *in vitro* y escasas pruebas *in vivo* (Argudo *et al.*, 2019; Thun *et al.*, 2002; Aires *et al.*, 2003).

## **1.6. Evaluación de la calidad del semen**

La fertilidad de los toros se vincula a múltiples factores. En poblaciones no seleccionadas hasta un 40% de los toros podrían ser subfértiles e incluso algunos estériles (poner referencia). La fertilidad de un toro se entiende como la capacidad de preñar a las vacas. En los grupos de cría, los toros más fértiles suelen enmascarar a los toros subfértiles (Kastelik y Thundathil, 2008).

El CASA es un sistema automatizado de alta eficiencia para el análisis computarizado de semen que cuantifica en forma objetiva los principales parámetros de la calidad y funcionalidad espermática, evaluando e identificando a cada espermatozoide individualmente y a la población en general (Amann y Waberski, 2014; Valverde y Madrigal-Valverde, 2018). Este sistema permite analizar de manera objetiva los espermatozoides según sus características cinemáticas en su trayectoria, determinando su motilidad, velocidad, linealidad y desplazamiento lateral, además de parámetros de concentración, morfología, morfometría, viabilidad (integridad de membrana plasmática) integridad acrosómica y fragmentación de ADN (Thundathil *et al.*, 2016). La evaluación de varios cientos de espermatozoides por campo asegura objetividad, precisión y rapidez en el estudio de parámetros vinculados con la fertilidad y viabilidad espermática (referencias).

Este equipo permite criterios de evaluación de estándares idénticos. Define valores claros con alta repetitividad y objetividad, que permiten detectar diferencias entre partidas de semen fresco, refrigerado y/o congelado, siendo esto imprescindible para obtener resultados fiables y objetivos. Permite detectar partidas de semen con baja calidad espermática, evitando el uso de un semen que se encuentra por debajo de los estándares de calidad aceptados

(Valverde y Madrigal-Valverde, 2018). La evaluación de los parámetros del semen vinculados a la fertilidad es de gran valor para el diagnóstico funcional epididimario, testicular y del tracto genital, permitiendo descartar casos de infertilidad o potencial subfertilidad (Rodríguez-Martínez, 2003). En bovinos se entiende que la dosis total inseminante (DI), entendida como en número total de espermatozoides con MP constituye un elemento fundamental para la fertilidad del semen se considera que la dosis requerida para una máxima fertilidad, contiene entre 5 y 20 millones de espermatozoides viables (Rodríguez-Martínez, 2003).

La Organización de los Estados Americanos (OEA) establece parámetros de calidad mínima para comercialización de semen en el Mercosur. Estos parámetros establecen un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales con movimiento progresivo al descongelado mayor al 30% y una DI mayor a 6 millones, sugiriéndose un mínimo de 10 millones. Para dosis superiores a 10 millones de espermatozoides normales con MP, el número total de espermatozoides anormales no será mayor al 30%, con defectos mayores, menores del 20% (OEA).

No queda muy claro, ni hay suficiente literatura científica respecto a cuáles son las características de la cinética espermática que se vinculan con mayor precisión a la fertilidad de los espermatozoides (Larsen *et al.*, 2000; Morrel *et al.*, 2018). En un estudio en humanos los parámetros que se correlacionaron fuertemente a la fertilidad fueron la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad de la trayectoria media (VAP), rectitud (STR) y frecuencia de cruzamientos o (BCF) (Larsen *et al.*, 2000). Respecto a semen bovino, Morrel *et al.*, (2018) analizaron varios parámetros con CASA y encontraron que los únicos que se correlacionaron con una mayor tasa de no retorno en bovinos de carne, fueron el índice de oscilación (WOB) y la morfología mientras que en los bovinos de leche no encontraron ningún parámetro que se correlacione de forma directa con la fertilidad.

### **1.7. Fertilización *in vitro* (FIV)**

La FIV es una biotecnología reproductiva de alta complejidad, mediante la cual se pueden obtener embriones viables en condiciones de laboratorio, que pueden ser implantados en receptoras con sus ciclos previamente sincronizados las cuales son capaces de llevar a término la gestación (referencias). La FIV en conjunto con otras técnicas reproductivas como el sexado del semen, la superovulación, transferencia de embriones y criopreservación de los mismos, permiten mejorar la eficiencia reproductiva de los animales y producir avances genéticos más rápidos, y puede ser asimismo una herramienta de conservación de una especie,

ya que es posible la criopreservación por tiempo indefinido de embriones (al igual que los gametos) sumergidos en Nitrógeno líquido (referencias).

En la actualidad además de analizar las características del semen, se evalúa su comportamiento mediante la FIV y en pruebas *in vivo*, siendo útil tanto en animales domésticos como en el ser humano (Rodríguez-Martínez, 2003). Los resultados obtenidos *in vitro* podrían considerarse predictivos de la fertilidad de los bovinos (Amann y Gill, 2000; Rodríguez-Martínez, 2003).

Los resultados obtenidos *in vitro* pueden aproximarnos a obtener valores de fertilidad predictivos cuando son comparados con los datos reales de preñez obtenidos por IA (Amann y Gill, 2000; Rodríguez-Martínez, 2003). Ya que las etapas de la fertilización del ovocito, ocurren de la misma forma *in vitro* e *in vivo*, existen numerosos reportes que correlacionan la fertilidad *in vitro* medida en porcentajes de clivaje y/o en desarrollo embrionario con la fertilidad *in vivo* de los toros y podría correlacionarse con la tasa de no retorno (Marquant-Le Guienne *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1997; Truelson *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2004). Los ensayos de FIV para evaluación de fertilidad se pueden realizar con ovocitos homólogos o heterólogos (Larsson y Miller, 2000; Kruger y Menkveld, 1986).

La raza del ganado bovino afecta significativamente los porcentajes de preñez obtenidos de embriones producidos por FIV, así como los porcentajes de mortalidad embrionaria (Arreseigor *et al.*, 2016a; Arreseigor *et al.*, 2016b). Esta biotecnología además de haberse implementado con bovinos de la especie *Bos taurus* con gran éxito, se ha utilizado en animales de razas *Bos indicus*, en las cuales, sin una explicación aparente se suele obtener mayor número de ovocitos recuperados por aspiración folicular (OPU, ovum pick up) (Pontes *et al.*, 2010).

No se han encontrado antecedentes de FIV en BCU, lo que hace que este trabajo sea novedoso, además de aportar al conocimiento e implicar un paso más hacia la reproducción de esta raza, así como a la aplicación de biotecnologías reproductivas como herramientas de conservación de especies.

## **1.8. SNPs y fertilidad**

Se entiende por polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP o “snips”) a la variación en una sola base nitrogenada del ADN entre individuos en una determinada región del genoma. Este tipo de polimorfismos distribuidos a lo largo del genoma es una de las fuentes más importantes de variación (1 cada 1000 pares de bases del ADN en promedio). Si bien la mayoría de estos cambios no presentan una justificada o probada

asociación, se sabe que algunos de ellos sí tienen correlación con enfermedades, alteraciones de la fertilidad, respuesta a fármacos, entre otros (*National Human Genome Research Institute*).

En rodeos comerciales, a pesar de que la eficiencia reproductiva tiene un alto impacto en la producción para los establecimientos y que los toros de baja fertilidad son descartados, la selección bovina está basada principalmente en cualidades productivas (carne, leche, índice de conversión, crecimiento, progenie, etc) en detrimento de las reproductivas. Las características reproductivas además de ser de baja heredabilidad, son consideradas componentes de manejo (Verde, 2019; Vergara *et al.*, 2008). El ganado BCU de la reserva utilizado en este estudio no fue sometido a ningún tipo de selección desde hace tiempo (Armstrong *et al.*, 2006 y Armstrong *et al.*, 2013).

Se han hecho pocos estudios de SNPs en BCU. Armstrong *et al.* (2011) realizaron la caracterización genética de estos animales para marcadores moleculares asociados al veteado de la carne (*DGATI*, *TG*, *LEP*) determinando un potencial productivo para carne magra (Armstrong *et al.*, 2011). Tanto éstos como otros estudios previos con microsatélites y ADN mitocondrial, muestran una relativamente alta diversidad genética de esta raza y bajo índice de endogamia (Armstrong *et al.*, 2006 y Armstrong *et al.*, 2013). El BCU es también utilizado desde la década de los 60 en cruzamientos en el norte del país (Rivera y Cerro Largo) con otras razas de carne (Aberdeen Angus, Hereford, Caracú y cebuinos) hallando en las cruzas un potencial para carne con mayor contenido graso con respecto al ganado puro (Armstrong *et al.*, 2011). Si bien se han realizado diversas investigaciones de SNPs en BC, no se han encontrado antecedentes en cuanto al estudio de SNPs o marcadores moleculares asociados a parámetros de fertilidad (REF).

Existe creciente evidencia de la influencia de factores genéticos en la fertilidad de los toros (Han y Peñagaricano, 2016). En los últimos años se han identificado utilizando estudios de asociación del genoma, varios SNPs asociados con motilidad espermática, volumen seminal y número de espermatozoides (Suchocki y Szyda, 2015). Esto puso en evidencia la existencia de un complejo mecanismo de regulación genética sobre estos parámetros de calidad seminal y fertilidad (Han y Peñagaricano, 2016). Por otra parte, la estimación de la fertilidad a través de la selección genética disminuye el intervalo intergeneracional e incrementa la intensidad y precisión de la selección (Han y Peñagaricano, 2016).

Han y Peñagaricano (2016) han estudiado la población completa de toros Holando de Estados Unidos, clasificados según su tasa de concepción (44.449 registros provenientes de 10.884 toros, desde 2008 a 2016). De esta población tenían disponibles los datos genotípicos de 7.447 toros, que utilizaron para estudiar la asociación entre fenotipos y genotipos con el fin de identificar SNPs presentes en los toros de mayor fertilidad y asignarlos a genes candidatos.

En su estudio excluyeron los SNPs presentes en cromosomas sexuales, reteniendo en el estudio solamente los SNPs que mapean a los autosomas. En sus resultados plantean una serie de genes vinculados fuertemente a los toros de mayor fertilidad. Suchocki y Szyda (2015), determinaron las características del semen de 1.212 toros Holando y su asociación con genes candidatos, teniendo en cuenta además de los autosomas, los cromosomas sexuales. De su estudio surge que varios de los genes de interés se encuentran localizados en el cromosoma X y sugieren que sean incluidos en estudios genéticos de fertilidad. Por otro lado, Hering *et al.* en toros Holando, estudiaron la asociación de genes candidatos autosómicos a motilidad seminal reducida (2014a), volumen seminal y número total de espermatozoides eyaculados (2014b). En la tabla 1 se presentan los genes donde se han localizado SNPs, que según la literatura científica actual se consideran más relevantes y son de especial interés para la selección genética de toros por su fertilidad.

Se define a la frecuencia alélica como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población por el número total de alelos. La suma de las distintas frecuencias alélicas será igual a 1. Si la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (H&W), las frecuencias genotípicas pueden expresarse como función de las frecuencias alélicas (Montenegro, 2012). La variación genética se entiende como la heterocigosidad de la población medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus (Lacadena, 1981).

La ley de H&W formula que, en una población bajo apareamiento aleatorio, sin selección, mutación o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. Una población se considera que está en equilibrio H&W para un locus si la proporción de genotipos observados puede ser completamente definida por las frecuencias alélicas del locus en cuestión, lo cual implica que ambos alelos están distribuidos al azar en la población y no existe asociación entre el par de alelos que un hijo recibe de sus padres. Una población en equilibrio H&W supone que los apareamientos son aleatorios, sin actual la selección, mutación y migración, la población debe ser infinitamente grande (se descarta el efecto de la deriva) y no existen diferencias en las frecuencias alélicas entre sexos. En un estudio sobre variación genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del equilibrio H&W en los loci estudiados, si una población se desvía significativamente del equilibrio puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones, a que existe migración o flujo de genes desde una fuente externa o se están produciendo apareamientos no aleatorios (Callen *et al.*, 1993).

El estadístico  $F_{is}$  es un parámetro para calcular las desviaciones de frecuencias genotípicas, medidas como la correlación entre dos alelos, siendo  $F_{is}$  la desviación de las frecuencias genotípicas observadas respecto a las esperadas, considerando el equilibrio H&W.



Los valores de  $F_{is}$  toman valores de -1 a +1, donde valores negativos implican exceso de heterocigotos, mientras que valores positivos exceso de homocigotos. Si  $F_{is}$  es igual a 0, implica que no hay endogamia y la población está en equilibrio H&W (Montenegro, 2012).

**Tabla 1: SNPs relevantes para fertilidad en bovinos**

GEN	CROMO-SOMA	REFERENCIA	EFFECTO ESTUDIADO	FUNCIÓN Y/O DESCRIPCIÓN
<i>IGFR1</i>	BTA21	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Familia de IGF1, rol importante en determinación sexual, desarrollo testicular, espermatogénesis y esteroidogénesis, proliferación y maduración de células de Sertoli, tamaño testicular y capacitación espermática
<i>TDRD9</i>	BTA21	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Codifica una proteína importante en la espermatogénesis
<i>CKB</i>	BTA21	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Codifica la enzima creatin-quinasa
<i>MGRN1</i>	BTA25	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Se expresa en el tracto reproductor masculino, ratones knockout para este gen son infértiles
<i>SEPT12</i>	BTA25	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Se expresa en el testículo, codifica una proteína de unión a GTP, implicada en la espermiogénesis, motilidad espermática e infertilidad
<i>CCT6A</i>	BTA25	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Codifica una proteína de interés en la interacción espermatozoide-ovocito durante la fertilización
<i>KAT8</i>	BTA25	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Miembro de la familia de MYST histona acetil-transferasa y se expresa durante el desarrollo espermático, juega un papel importante en el desarrollo embrionario temprano
<i>PARP11</i>	BTA5	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Vinculado a maduración y motilidad espermática
<i>AKAP3</i>	BTA5	Han y Peñagaricano (2016)	Tasa de concepción	Vinculado a maduración y motilidad espermática
<i>7SK</i>	BTA10	Suchocki y Szyda (2015)	Motilidad espermática	Codifica un pequeño RNA nuclear
<i>HS6ST2</i>	BTX	Suchocki y Szyda (2015)	Concentración espermática	Heparin-sulfato 6-O-sulfatotransferasa
<i>MAGEB10</i>	BTX	Suchocki y Szyda (2015)	Volumen seminal y número de espermatozoides	Familia del antígeno melanoma B10
<i>DCP1A</i>	BTA22	Hering <i>et al.</i> (2014b)	Volumen seminal y número de espermatozoides	De-captación de ARNm
<i>SFMBT1</i>	BTA22	Hering <i>et al.</i> (2014b)	Volumen seminal y número de espermatozoides	Represión de la transcripción
<i>TMEM110</i>	BTA22	Hering <i>et al.</i> (2014b)	Volumen seminal y número de espermatozoides	Función desconocida
<i>KCNK10</i>	BTA10	Hering <i>et al.</i> (2014b)	Volumen seminal	Se expresa en células germinales y se vincula de forma indirecta a la calidad seminal
<i>R8FOX1</i>	BTA25	Hering <i>et al.</i> (2014b)	Número de espermatozoides	Proteína de unión a ARN, homólogo a FOZ-1
<i>LOC785875</i>	BTA1	Hering <i>et al.</i> (2014a)	Motilidad espermática pobre	Codifica el Receptor olfativo similar a 5K3 que tiene un rol quimiotáctico y en la regulación espermática
<i>PDZRN4</i>	BTA5	Hering <i>et al.</i> (2014a)	Motilidad espermática pobre	Actividad en ubiquitin proteína-ligasa (polipéptido de cadena simple, participa en la degradación de proteínas defectuosas)
<i>ETNK1</i>	BTA5	Hering <i>et al.</i> (2014a)	Motilidad espermática pobre	Muy específico para la fosforilación de etanolamina. Controla la velocidad en la biosíntesis de fosfatidiletanolamina
<i>MC4R</i>	BTA24	Hering <i>et al.</i> (2014a)	Motilidad espermática pobre	Participa en la homeostasis energética y crecimiento somático. Este receptor está mediado por proteínas G que estimulan la adenil-ciclasa (cAMP)
<i>SOX5</i>	BTA5	Hering y Kamiński (2016)	Concentración y motilidad espermática	Activa o reprime genes importantes para hiperactivación seminal, motilidad flagelar y estructura del axonema

## 2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

En la reserva del Parque Nacional de San Miguel (Departamento de Rocha, Uruguay) perteneciente al Servicio de Parques del ejército (SEPAE, Ministerio de Defensa) hay aproximadamente 600 animales BCU, los cuales reciben un manejo mínimo, limitado a desparasitaciones periódicas y vacunaciones exigidas por el MGAP. Sin embargo, estos animales están concentrados en un mismo lugar, lo que supone un riesgo muy alto de extinción en el caso de emergencia sanitaria o ambiental. Dada la importancia de la conservación de la biodiversidad de estos animales, es muy importante conocer su fertilidad con la mayor precisión posible, para poder aplicar técnicas de reproducción asistida que nos aseguren preservar la especie.

La necesidad de crear un banco de germoplasma determina conocer la calidad del semen de los toros BCU de la reserva. También será de utilidad conocer el efecto de distintos diluyentes de semen en la FIV del ganado BCU. Hasta el momento, no hemos encontrado referencias sobre la FIV en bovinos de raza BCU, tampoco encontramos en la literatura que se compare el efecto de los diluyentes en la fertilidad *in vitro* en ninguna raza bovina, por lo cual se considera de interés adicional esta propuesta. Este proyecto constituye una primera aproximación a estas técnicas para la producción futura de embriones de BCU producidos *in vitro*.

Por otro lado, es posible establecer una relación entre genes o regiones del genoma responsables de variación en aspectos reproductivos, estudios recientes que se consideraron de referencia, han conseguido establecer genes vinculados a la reproducción, tanto para fertilidad de los toros como para calidad espermática en bovinos (Han y Pañagaricano, 2016; Hering et al., 2014; Suchocki y Szyda, 2015). Por este motivo el estudio de SNPs alojados en genes relacionados a calidad seminal, tasa de concepción y fertilidad en los 26 toros existentes de la reserva, resulta de interés, siendo estos los únicos progenitores y propagadores de genes para las próximas generaciones de BCU, permitiendo también estudios de variabilidad genética para estas características.

### **3. HIPÓTESIS**

El semen criopreservado de toros BCU presenta buena calidad espermática post-descongelamiento y buenos índices de FIV independientemente del diluyente comercial utilizado (Triladyl® y Andromed®).

Los toros BCU de la reserva de San Miguel presentan variabilidad alélica (SNPs) para genes candidatos relacionados con fertilidad.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Realizar análisis de variabilidad genética y determinar parámetros de calidad y capacidad fertilizante *in vitro* de semen congelado de Toros BCU.

#### **4.2. Objetivos Específicos**

1. Analizar características de calidad del semen criopreservado de distintos toros del banco de BCU.
2. Comparar la fertilidad *in vitro* del semen criopreservado de distintos toros BCU.
3. Conocer el efecto de dos diluyentes de semen en las características y fertilidad *in vitro* de semen congelado de toros BCU.
4. Analizar la variabilidad genética de los reproductores machos de la reserva de San Miguel para SNPs identificados en genes relevantes para la calidad seminal y fertilidad.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Lugar tiempo y animales**

En el banco hay existencias de semen pertenecientes a 12 toros, contiene gran cantidad de pajuelas de 8 de ellos y muy pocas de los otros 4 toros, por lo cual, se utilizaron 8 toros para el estudio. Para la colecta, todos los toros se encontraban en campo natural, pero dado que la misma fue realizada en distintas estaciones del año (algunas en otoño y otras en primavera, desde el año 2017 hasta el 2019) con toros de distintas edades, pesos y actividad sexual, nos enfocamos a estudiar estrictamente la calidad del semen existente. Se realizaron tres experimentos que incluyeron el estudio de semen de 8 toros, diluido en dos diluyentes comerciales, seleccionando luego el semen de 4 toros que mostraron mejores cualidades para ser utilizado en FIV. Los 26 toros fueron utilizados para el estudio de marcadores moleculares de tipo SNP.

### **5.2. Estrategia de investigación**

Se realizaron 3 experimentos:

En el Experimento 1 se realizó la evaluación objetiva del semen criopreservado de toros de la raza BCU (registro ARU) en dos diluyentes comerciales de semen con y sin yema de huevo, por medio del Sistema computarizado CASA con el fin de conocer la calidad seminal por medio de parámetros objetivos. También se estudió la integridad funcional de la membrana por medio del test hiposmótico (Olivera *et al.*, 2010).

En el Experimento 2 se realizaron pruebas de FIV con el semen congelado de los toros seleccionados en el Experimento 1.

El Experimento 3 consistió en la evaluación de SNPs vinculados a la fertilidad para los distintos toros asociados a genes de interés, seleccionados en base a la literatura científica de referencia (Han y Pañagaricano, 2016; Hering *et al.*, 2014; Suchocki y Szyda, 2015) seleccionando aquéllos que figuran como los más significativamente asociados a parámetros de calidad de semen y/o fertilidad en toros.

### 5.3. Colecta y criopreservación del semen

La extracción del semen se realizó con electroeyaculación (protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Proyecto I+D, CSIC, Udelar, id. 508, Llambí y Armstrong, 2016). Cada eyaculado fue diluido al doble de volumen con los respectivos diluyentes que se describen a continuación en baño María a 37 °C e inmediatamente fue sometido a una evaluación preliminar subjetiva a campo considerando aspecto, color, volumen, motilidad de masa macro y microscópica, motilidad progresiva en portaobjeto cubierto con cubreobjetos bajo microscopio de contraste de fase a 400x utilizando platina térmica y proporción de vivos y muertos con eosina-nigrosina en frotis a 1000x (Chenoweth, 2002). Se seleccionaron muestras para criopreservar con motilidad de masa de 1 o más (escala 0-3) y al menos 70% de MP (Chenoweth, 2002).

Se preparó el diluyente según recomendación del fabricante y se mantuvo en baño de agua a 37°C. En caso de Andromed®, a una parte de solución madre se le agregaron 4 partes de agua destilada estéril. En caso de Triladyl®, se preparó agregando 1 parte de solución madre en 3 partes de agua destilada estéril y una parte de yema de huevo.

Se calculó la concentración de espermatozoides de cada eyaculado utilizando cámara de Neubauer (Marienfeld Co., Improved) a una dilución 1/200 en buffer fosfato salino (Mellisho, 2010)

A cada eyaculado se lo dividió en dos fracciones de similar volumen, una de ellas fue diluida en Andromed® y la otra en Triladyl®, agregando lentamente el diluyente para obtener una concentración final de por lo menos  $60 \times 10^6$  espermatozoides/ml y se envasó el semen diluido en pajuelas de 0.5 ml, que se identificaron de forma individual (Llambí y Armstrong, 2016).

Las pajuelas para ambos diluyentes fueron refrigeradas a 5 °C durante 2h, luego se colocaron a 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido, transcurridos 10 min se sumergieron directamente en nitrógeno líquido para su criopreservación.

#### **5.4. Experimento 1: Evaluación de la calidad del semen de 8 toros congelado con 2 diluyentes comerciales (Andromed® y Triladyl®)**

En el estudio se utilizaron muestras de semen de ocho toros (0850, 0853, 1026, 1035, 3733, 5834, 9701, 9714), cuyos eyaculados fueron procesados y congelados previamente en dos diluyentes comerciales: Andromed® (A) y Triladyl® (T).

Las pajuelas fueron descongeladas a Baño María a 37 °C, para todas las manipulaciones se utilizó platina térmica, se realizaron evaluaciones inmediatamente post-descongelación mediante un equipo CASA (AndroVision® Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania) seteado para bovinos (inmóviles: BCF<3; motiles locales: VCL<25 µm/s; considerando progresivos a la suma de circulares, lentos y rápidos; circulares: radio >10<50, lentos: VCL<35 µm/s y rápidos: VCL>35 µm/s). Se estudiaron un total de 4 campos por muestra, para el estudio se consideraron 100 espermatozoides de cada campo seleccionados de forma aleatoria (total: 400 espermatozoides/muestra). Se determinaron los siguientes parámetros: número total de espermatozoides y concentración espermática, motilidad total (%) y progresiva (%), porcentaje de espermatozoides con motilidad rápida, lenta, circular, motilidad total e inmóviles. También se estudiaron aspectos de la morfología (porcentajes de cabeza anormal, cabeza desprendida, pieza intermedia anormal, gota proximal, gota distal, cola doblada, cola enrollada, anomalías totales) y cinética espermática: velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad de la línea recta (VSL, µm/s), velocidad de la trayectoria media (VAP, µm/s), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm), frecuencia de cruzamientos (BCF, Hz), índice de hiperactivación (HAC, rad) y los índices de oscilación (WOB: VAP/VCL), linealidad (LIN: VSL/VCL) y rectitud de la trayectoria (STR: VSL/VAP) (Valverde y Madrigal, 2018; Amann y Waberski, 2014).

Todos los parámetros antes indicados fueron estudiados a la hora 0 y tras 2 h de incubación a 37 °C (test de termoresistencia) (Dhami *et al.*, 1994).

Para comprobar funcionalidad de la membrana plasmática a la hora 0 se realizó el test hiposmótico (HOST). Se incubaron 5 µl de semen en 45 µl de una solución de sucrosa hiposmótica (100 mOsm/L) en baño de agua por 25 minutos a 37 °C, posteriormente se observaron 200 espermatozoides para cada muestra sobre un portaobjetos en microscopio con contraste de fase (400X) considerando espermatozoides con membrana funcional los que reaccionaron al medio hiposmótico con dilatación o enrollamiento de la parte distal de la cola (Olivera *et al.*, 2010).

Se procesaron en total 16 muestras de semen, 2 de cada toro (del mismo eyaculado, en ambos diluyentes), 8 de cada diluyente. Los grupos se clasificaron según el número de toro y

diluyente: A-0850, A-0853, A-1026, A-1035, A-3733, A-5834, A-9701, A-9714, T-0850, T-0853, T-1026, T-1035, T-3733, T-5834, T-9701, T-9714.

### **5.5. Experimento 2: Evaluación de la fertilidad *in vitro* del semen de 4 toros congelado en dos diluyentes comerciales**

Se realizaron 6 repeticiones experimentales, en cada una se utilizaron 8 muestras de semen (de los 4 toros que presentaron mejor MP a la evaluación, diluidas en A y T), con las cuales fueron se fertilizaron COC obtenidos de frigoríficos locales.

Se obtuvo 404 COC de ovarios bovinos de menos de 5 h de faenados, transportados en solución salina isotónica a 37°C. El contenido de los folículos de 2 a 8 mm de diámetro se aspiró mediante jeringa con aguja hipodérmica 18G, utilizando medio buffer fosfato salino modificado (m-PBS), con 5% de SFB y antibióticos (Penicilina–Estreptomicina). Se seleccionó los COC clase A (más de tres capas de células del *cúmulus* y citoplasma homogéneo) (Liebfried y First, 1979). Los COC se lavaron con m-PBS y se cultivaron para maduración en medio comercial TCM-199 adicionado con 5% de SFB y hormonas (FSH, 0.005 UI/ml; hCG, 10 UI/ml y Estradiol, 1 mg/ml) en gotas de 100 µl en grupos de 15 COC por gota, cubiertos con aceite mineral, en incubadora (38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% humedad) por 22 h (Filipiak *et al.*, 2017).

Se formaron 8 grupos de COC que fueron inseminados con el semen de los distintos toros seleccionados, obtenido del mismo eyaculado y congelado en ambos diluyentes (toros 1026, 3733, 5834 y 9701, congelados en A y T). El semen se seleccionó por gradiente de Percoll® (Sigma-Aldrich) (90-45%) en Talp-Sperm que consiste en un medio TALP constituido en el laboratorio y enriquecido con cafeína y albúmina de suero bovino (ASB). Se centrifugó a 800G por 20 minutos y se aspiró el sobrenadante. Al *pellet* que quedó en el fondo del tubo se le agregó medio Talp-Sperm y centrifugó 5 minutos a 500G, se retiró el sobrenadante y el *pellet* se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^6$  spz/ml con solución de fertilización Talp-Fert, que consiste en el medio TALP adicionado con ASB, después de determinar la concentración total con la cámara de Neubauer. En platina caliente (37 °C), se formaron gotas de 100 µl cubiertas con aceite mineral y se colocaron los COC que fueron sometidos a maduración, en una relación de 15 COC por gota. Se colocó en incubadora (38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad) (Filipiak *et al.*, 2017).

Después de 18 h de incubación con los espermatozoides, los presuntos cigotos se cultivaron en medio de desarrollo CR1aa con 5% de SFB, en incubadora (38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad). Se realizó el estudio del clivaje a las 48 h. Se contabilizó la cantidad de



embriones divididos en 2, 4 y 8 células respecto a los ovocitos sometidos a fertilización para cada grupo. A los 7 días de iniciada la FIV se evaluó el desarrollo de los embriones a estadios transferibles. Se valoró el desarrollo embrionario y su calidad de acuerdo a los estándares internacionales de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2013).

### **5.6. Experimento 3: Evaluación de marcadores moleculares de ADN (SNPs) asociados a la fertilidad en bovinos**

Se identificó el genotipo para los SNPs localizados en genes relacionados con calidad seminal y fertilidad de los 26 toros existentes en la reserva de San Miguel.

Se aisló ADN de los 26 toros a partir de folículo piloso utilizando un kit comercial de extracción de ácidos nucleicos (*MagMAX<sup>TM</sup> -96DNA Multi-Sample Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific a*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cuantificó y valoró la integridad del ADN extraído [en geles de agarosa al 1% y equipo *NanoDrop<sup>TM</sup> ND-1000 UV-vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE)* Laboratorio de Genética-FVET]. Se determinó la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop<sup>TM</sup> 1000*. El ADN se conservó congelado a -20 °C en freezer de frío seco.

Las muestras se enviaron a genotipar a la empresa Genexa (Uruguay), con el panel de genotipado masivo *Axiom Bovine v3 de Affymetrix (ThermoFisher Scientific b)*.

Los SNPs analizados se seleccionaron en base a su ubicación en los genes candidatos mencionados (*IGF1, IGFRI, SEPT12, CCT6A, 7SK, HS6ST2, SFMBT1, SOX5*) y a las bases de datos genómicas (ENSEMBL, <http://www.ensembl.org>). Se calculó las frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas, equilibrio H&W (H&W) y coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) (Grisolía *et al.*, 2003)

### **5.7. Análisis estadístico**

Para el estudio estadístico de las variables cinética se consideró solamente a los espermatozoides móviles progresivos (Lasrsen *et al.*, 2000). El test T se aplicó para cada variable, comparando A y T y 0h y 2h y las diferencias se consideraron estadísticas con un nivel de significación del 5% o menos.

Para estudiar las diferencias entre los grupos de semen (16 grupos) de forma de poder categorizarlos, se utilizaron percentiles, ubicando a cada uno en los percentiles 1: 0.00-0.25; 2:

0.25-0.50; 3: 0.50-0.75; 4: 0.75-1.00, en donde las mejores pajuelas analizadas para cada parámetro se ubican en el percentil 4 mientras que las de peor calidad relativa en el percentil 1. La calidad final del semen para los parámetros de cinética se clasificó utilizando el índice combinado de los percentiles obtenidos para estas variables, asignando a las muestras con las mejores características combinadas de cinética un valor mayor. Se realizaron estudios de correlación lineal para los percentiles de las variables de MP, cinética espermática y HOST.

Los resultados de clivaje y desarrollo embrionario en FIV se analizaron por el test de Chi cuadrado.

Se determinaron frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas y equilibrio H&W (H&W). Se calculó el coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) (Grisolía *et al.*, 2003).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Experimento 1: Estudio del semen (CASA)

La DI fue mayor a  $6 \times 10^6$  espermatozoides (valor mínimo aceptado por la OEA) en 10 muestras, ordenadas de mayor a menor estas fueron: T-1026, A-9701, T-9714, A-9714, T-0853, T-9701, A-5834, T-1035, T-3733, A-1026 (tabla 2).

La MP de las muestras estudiadas fue menor al valor de referencia de 30% (OEA).

Para cinética (hora 0) fue similar el efecto de A y T ( $p > 0.05$ ) con mayor proporción de espermatozoides móviles lentos y locales ( $p < 0.05$ ) en semen diluido en T. VCL fue mayor en semen diluido en A ( $p < 0.05$ ) BCF fue mayor en T ( $p < 0.05$ ) (tabla 2).

Entre h0 y h2, hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) disminuyendo las medias de los parámetros de motilidad seminal para ambos diluyentes tomados en conjunto, salvo la media de la motilidad circular que se vio aumentada a las 2 h, así como la media de espermatozoides inmóviles. La media de los patrones de movimiento VCL, VSL, VAP y STR, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre h0 y h2 (tablas 2 y 3; figura 1).

Al estudiar valores obtenidos con los diluyentes A y T a las horas 0 y 2, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la variación media de los parámetros de motilidad total y progresiva (tabla 2). Se encontraron diferencias significativas en la disminución media de la BCF ( $p < 0.05$ ) presentando las muestras de semen diluido en T una mayor disminución a las 2 horas (figura 3) y una tendencia a aumentar la media de VSL y VAP ( $p = 0.055$  y  $p = 0.061$ , respectivamente) a favor de las muestras de semen diluido en T (movimiento más rectilíneo en T) (tabla 3).

**Tabla 2: Resultados obtenidos por pajuela de 0.5 mL a la hora 0 y a las 2 horas de incubación a 37 °C, de espermios progresivos por dosis, concentración espermática y porcentajes de motilidad de las muestras de semen descongelado de los toros BCU**

Hora 0 Toro	DI [10 <sup>6</sup> ]	CE [10 <sup>9</sup> /ml]	MP [%]	MR [%]	ML [%]	MC [%]	MLoc. [%]	MT [%]	EI [%]
A-0850	5.71	129.11	8.84	7.81	0.91	0.12	1.51	10.36	89.64
A-0853	2.66	70.54	7.54	5.43	1.77	0.33	0.78	8.31	91.69
A-1026	6.18	76.25	16.21	12.31	3.79	0.10	4.21	20.41	79.59
A-1035	3.95	83.37	9.47	7.60	1.59	0.28	1.50	10.98	89.02
A-3733	4.46	90.95	9.80	7.91	1.63	0.26	3.10	12.90	87.10
A-5834	9.89	93.38	21.19	12.06	8.71	0.42	8.21	29.40	70.60
A-9701	18.45	127.00	29.06	22.91	5.91	0.25	6.90	35.96	64.04
A-9714	11.81	188.94	12.50	9.52	2.98	0.00	4.43	16.93	83.07
<i>Promedio A</i>	<i>7.89<sup>a</sup></i>	<i>107.44<sup>a</sup></i>	<i>14.33<sup>a</sup></i>	<i>10.69<sup>a</sup></i>	<i>3.41<sup>b</sup></i>	<i>0.22<sup>a</sup></i>	<i>3.83<sup>b</sup></i>	<i>18.16<sup>a</sup></i>	<i>81.84<sup>a</sup></i>
T-0850	5.90	63.97	18.46	14.67	3.67	0.12	3.06	21.52	78.48
T-0853	11.62	169.70	13.69	6.91	6.77	0.00	8.66	22.35	77.65
T-1026	18.57	169.70	21.89	13.36	8.53	0.00	10.74	32.63	67.37
T-1035	9.15	117.85	15.53	8.69	6.77	0.07	6.50	22.03	77.97
T-3733	8.52	78.20	21.80	15.30	6.00	0.50	5.30	27.10	72.90
T-5834	5.24	78.75	13.31	7.35	5.86	0.10	7.55	20.85	79.15
T-9701	10.60	121.53	17.44	11.20	6.11	0.13	6.18	23.62	76.38
T-9714	16.81	205.13	16.39	10.33	6.02	0.04	9.30	25.70	74.30
<i>Promedio T</i>	<i>10.80<sup>a</sup></i>	<i>125.60<sup>a</sup></i>	<i>17.31<sup>a</sup></i>	<i>10.98<sup>a</sup></i>	<i>6.22<sup>a</sup></i>	<i>0.12<sup>a</sup></i>	<i>7.16<sup>a</sup></i>	<i>24.48<sup>a</sup></i>	<i>75.53<sup>a</sup></i>
<i>Promedio general</i>	<i>9.3</i>	<i>116.52</i>	<i>15.82<sup>**</sup></i>	<i>10.84<sup>**</sup></i>	<i>4.81<sup>**</sup></i>	<i>0.17<sup>**</sup></i>	<i>5.50<sup>**</sup></i>	<i>21.32<sup>**</sup></i>	<i>78.69<sup>*</sup></i>
Hora 2 Toro	DI [10 <sup>6</sup> ]	CE [10 <sup>9</sup> /ml]	MP [%]	MR [%]	ML [%]	MC [%]	MLoc [%]	MT [%]	EI [%]
A-0850	6.41	136.00	9.43	7.88	1.50	0.06	2.47	11.90	88.10
A-0853	5.05	81.64	12.36	7.09	4.98	0.29	3.45	15.80	84.20
A-1026	8.14	111.60	14.58	8.97	5.54	0.07	5.12	19.69	80.31
A-1035	4.89	115.35	8.47	6.64	1.69	0.14	2.03	10.51	89.49
A-3733	4.93	88.45	11.14	8.93	1.95	0.27	3.89	15.03	84.97
A-5834	2.54	117.85	4.31	3.32	1.00	0.00	1.73	6.04	93.96
A-9701	6.10	96.03	12.70	9.36	3.01	0.33	2.69	15.39	84.61
A-9714	7.71	183.70	8.39	6.43	1.96	0.00	3.19	11.58	88.42
<i>Promedio A</i>	<i>5.59</i>	<i>114.89</i>	<i>10.03</i>	<i>7.29</i>	<i>2.61</i>	<i>0.13</i>	<i>2.91</i>	<i>13.24</i>	<i>87.06</i>
T-0850	4.58	103.39	8.85	7.03	1.82	0.00	1.66	10.51	89.49
T-0853	11.02	182.68	12.07	5.95	6.12	0.00	6.29	18.36	81.64
T-1026	11.81	148.67	15.89	7.63	8.26	0.00	8.78	24.67	75.33
T-1035	8.84	190.66	9.27	6.89	2.38	0.00	2.87	12.14	87.86
T-3733	4.69	95.96	9.78	6.52	3.18	0.08	3.02	12.80	87.20
T-5834	1.60	90.56	3.54	2.68	0.86	0.00	0.95	4.49	95.51
T-9701	3.20	101.74	6.30	4.46	1.77	0.08	2.00	8.30	91.70
T-9714	6.02	193.95	6.21	4.44	1.77	0.00	3.47	9.68	90.32
<i>Promedio T</i>	<i>6.74</i>	<i>143.46</i>	<i>9.01</i>	<i>5.51</i>	<i>3.48</i>	<i>0.02</i>	<i>3.91</i>	<i>12.62</i>	<i>87.08</i>
<i>Promedio general</i>	<i>6.17</i>	<i>129.18</i>	<i>9.52<sup>*</sup></i>	<i>6.40<sup>*</sup></i>	<i>3.05<sup>*</sup></i>	<i>0.08<sup>*</sup></i>	<i>3.41<sup>*</sup></i>	<i>12.93<sup>*</sup></i>	<i>87.07<sup>**</sup></i>

DI: espermios progresivos por dosis; CE: concentración espermática; MP: MP; MR: motilidad rápida; ML: motilidad lenta; MC: motilidad circular; MLoc: Motilidad local; MT: motilidad total; EI: espermios inmóviles  
Diferentes superíndices indican diferencias significativas

<sup>\*\*</sup>/<sup>\*</sup>indica diferencias significativas entre la hora 0 y tras 2 h de incubación a 37 °C

**Tabla 3: Resultados obtenidos de cinética espermática a la hora 0 y tras 2 h de incubación en baño María a 37 °C**

<b>Hora 0 Toro</b>	<b>VCL [µm/s]</b>	<b>VSL [µm/s]</b>	<b>VAP [µm/s]</b>	<b>ALH [µm]</b>	<b>BCF [Hz]</b>	<b>WOB [VAP/VCL]</b>	<b>LIN [VSL/VCL]</b>	<b>STR [VSL/VAP]</b>
A-0850	187.69	142.82	150.96	0.79	6.52	0.71	0.65	0.82
A-0853	162.82	107.23	119.16	1.22	9.56	0.68	0.61	0.84
A-1026	151.07	86.91	97.48	1.14	9.97	0.59	0.51	0.78
A-1035	182.09	115.13	122.40	1.15	13.61	0.64	0.59	0.85
A-3733	182.09	115.13	122.40	1.15	13.61	0.64	0.59	0.85
A-5834	125.41	65.42	74.29	1.24	14.29	0.56	0.48	0.81
A-9701	167.03	72.69	87.50	1.63	12.19	0.51	0.42	0.76
A-9714	158.39	91.26	101.57	1.16	9.05	0.60	0.53	0.78
<i>Promedio A</i>	<i>164.57<sup>a</sup></i>	<i>99.57<sup>a</sup></i>	<i>109.47<sup>a</sup></i>	<i>1.19<sup>a</sup></i>	<i>11.10<sup>b</sup></i>	<i>0.62<sup>a</sup></i>	<i>0.55<sup>a</sup></i>	<i>0.81<sup>a</sup></i>
T-0850	148.22	69.46	84.14	1.45	13.04	0.53	0.43	0.75
T-0853	118.18	82.95	88.43	0.82	14.28	0.69	0.64	0.88
T-1026	132.85	78.78	86.55	0.99	14.08	0.61	0.55	0.84
T-1035	126.51	79.61	85.40	0.89	16.66	0.60	0.55	0.86
T-3733	197.37	122.58	133.22	1.21	11.54	0.63	0.56	0.82
T-5834	120.44	77.01	82.81	0.99	15.57	0.63	0.58	0.88
T-9701	148.74	90.90	99.71	1.06	11.83	0.62	0.55	0.82
T-9714	136.75	84.36	91.87	0.99	11.80	0.63	0.57	0.84
<i>Promedio T</i>	<i>141.13<sup>b</sup></i>	<i>85.70<sup>a</sup></i>	<i>94.02<sup>a</sup></i>	<i>1.05<sup>a</sup></i>	<i>13.60<sup>a</sup></i>	<i>0.62<sup>a</sup></i>	<i>0.55<sup>a</sup></i>	<i>0.84<sup>a</sup></i>
<b>Hora 2 Toro</b>	<b>VCL [µm/s]</b>	<b>VSL [µm/s]</b>	<b>VAP [µm/s]</b>	<b>ALH [µm]</b>	<b>BCF [Hz]</b>	<b>WOB [VAP/VCL]</b>	<b>LIN [VSL/VCL]</b>	<b>STR [VSL/VAP]</b>
A-0850	188.98	140.31	148.17	0.84	7.31	0.72	0.66	0.86
A-0853	134.54	79.59	89.51	1.18	11.69	0.61	0.54	0.83
A-1026	138.41	74.76	86.25	1.22	10.08	0.57	0.48	0.77
A-1035	172.66	122.03	129.88	0.89	6.39	0.71	0.65	0.83
A-3733	167.71	101.88	109.99	1.21	8.59	0.63	0.58	0.84
A-5834	172.43	143.13	146.25	0.57	6.84	0.77	0.75	0.91
A-9701	156.99	81.39	94.61	1.50	11.83	0.55	0.46	0.79
A-9714	163.31	126.58	133.72	0.81	6.98	0.74	0.69	0.87
<i>Promedio A</i>	<i>161.88</i>	<i>108.71<sup>(*)</sup></i>	<i>117.30<sup>(*)</sup></i>	<i>1.03</i>	<i>8.71<sup>*</sup></i>	<i>0.66</i>	<i>0.60</i>	<i>0.84</i>
T-0850	169.29	108.18	118.53	1.14	10.32	0.64	0.57	0.83
T-0853	125.90	85.86	91.90	0.87	12.83	0.66	0.61	0.86
T-1026	117.21	67.35	75.01	1.02	13.84	0.61	0.54	0.84
T-1035	159.63	114.89	121.91	0.83	8.63	0.67	0.61	0.83
T-3733	145.03	89.69	98.30	1.11	8.63	0.62	0.55	0.81
T-5834	201.39	180.57	183.62	0.35	2.20	0.84	0.81	0.89
T-9701	147.93	105.87	112.52	0.95	9.93	0.68	0.63	0.84
T-9714	169.69	134.05	141.53	0.66	5.19	0.74	0.66	0.82
<i>Promedio T</i>	<i>154.51</i>	<i>110.81<sup>(**)</sup></i>	<i>117.92<sup>(**)</sup></i>	<i>0.87</i>	<i>8.95<sup>**</sup></i>	<i>0.68</i>	<i>0.62</i>	<i>0.84</i>

Diferentes superíndices indican diferencias significativas

\*\*/\* Indica diferencias significativas en el aumento o disminución tras 2 h de incubación a 37 °C

(\*)/(\*\*) Indica tendencia

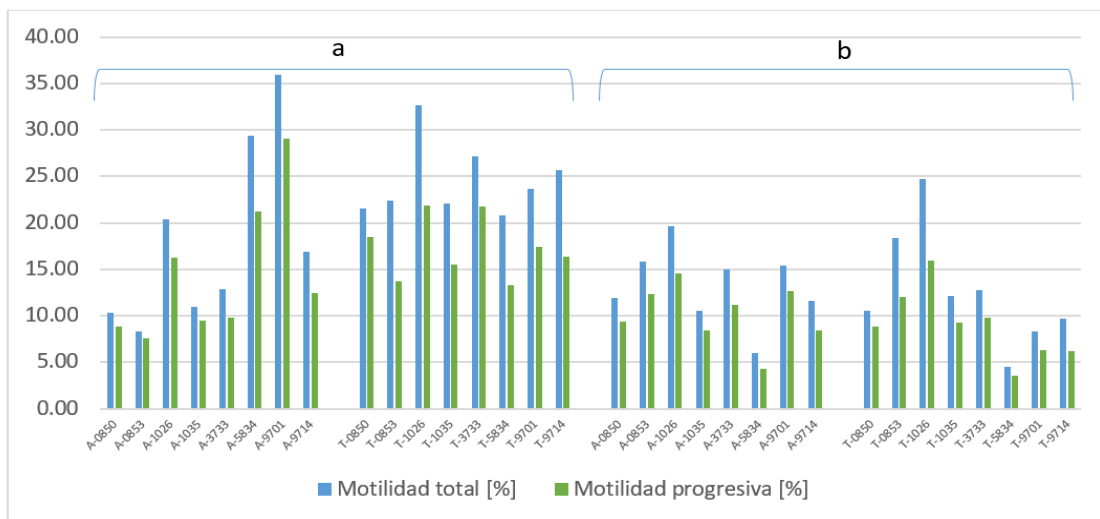


Figura 1: Motilidad total y progresiva a la h0 y tras 2h de incubación a 37 °C

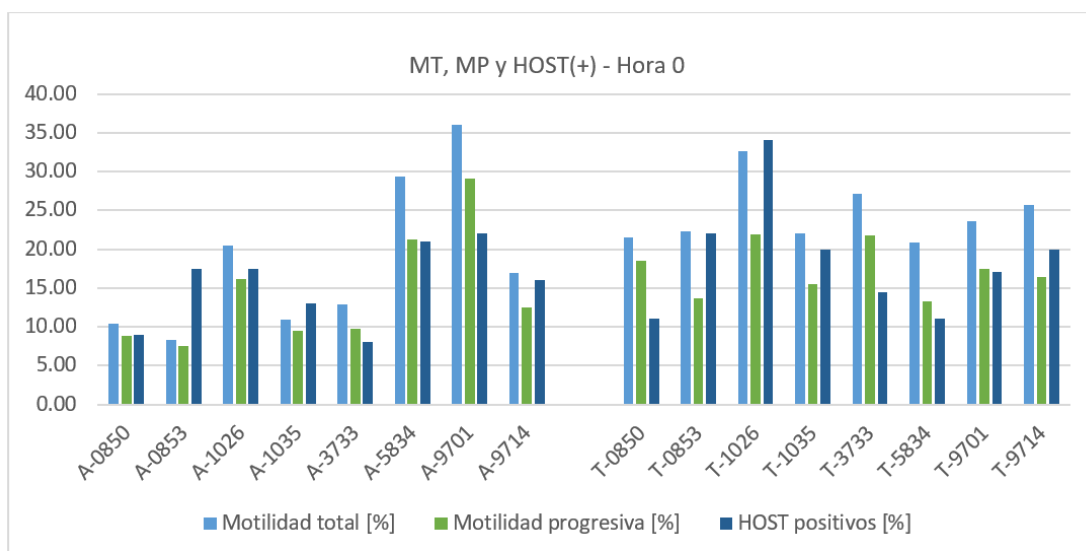


Figura 2: Motilidad total, progresiva y HOST a la hora 0

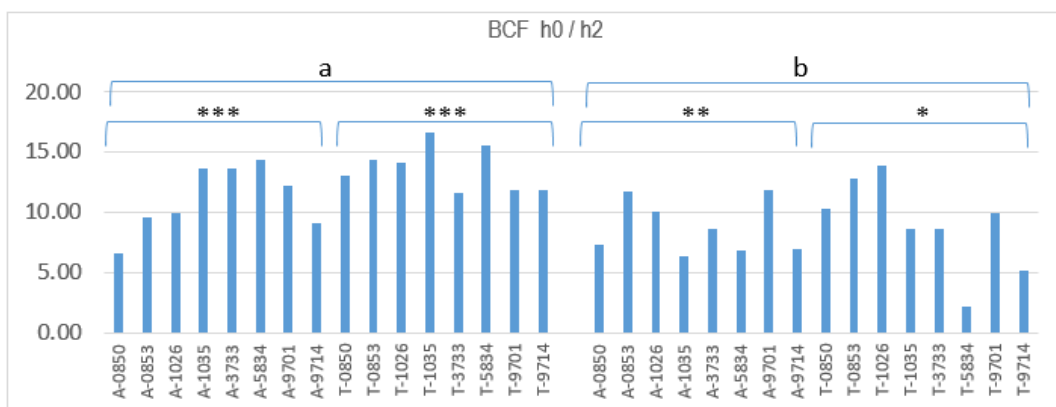


Figura 3: BCF a la hora 0 y tras 2 horas de incubación a 37 °C

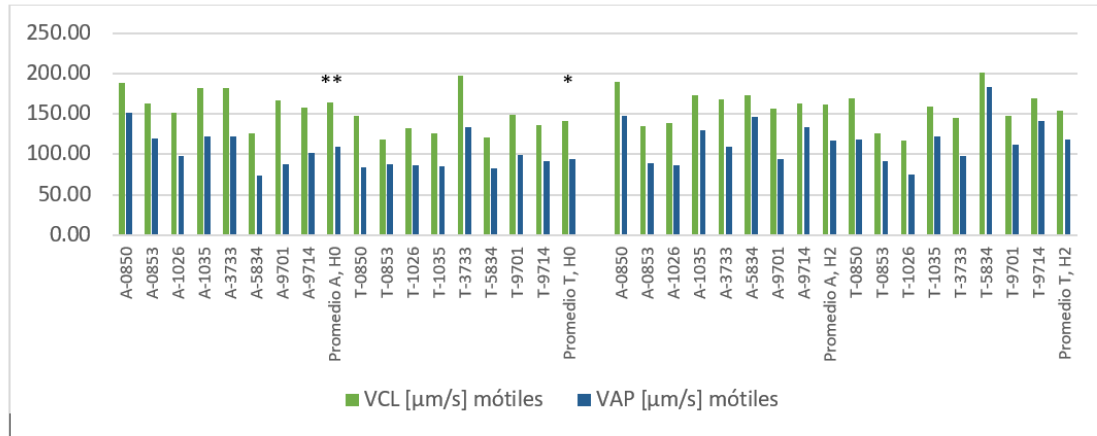


Figura 4: VCL y VAP a la hora 0 y tras 2 horas de incubación a 37 °C

Los percentiles para los parámetros VCL, VAP, STR, BCF y WOB y su índice combinado el cual fue obtenido promediando el valor de los percentiles obtenidos, se presentan ordenados de forma decreciente según las muestras que combinadas presentaron las mejores características en la tabla 4.

Tabla 4: Percentiles para los parámetros de cinética seleccionados y su índice combinado

Toro	VCL [ $\mu\text{m/s}$ mótiles*	VAP [ $\mu\text{m/s}$ mótiles*	STR [VSL/VAP] mótiles*	BCF [Hz] mótiles*	WOB [Hz] mótiles*	Índice combinado de los valores asignados a los percentiles
A-1035	4	4	4	3	4	3.8
A-3733	4	4	2	3	3	3.2
T-3733	4	4	2	2	3	3
T-0853	1	2	4	4	4	3
A-0850	4	4	2	1	4	3
A-0853	3	3	3	1	4	2.8
T-5834	1	1	4	4	3	2.6
T-1026	2	2	3	3	2	2.4
T-9701	2	3	3	2	2	2.4
T-1035	1	1	4	4	2	2.4
T-9714	2	2	3	2	3	2.4
A-9714	3	3	1	1	2	2
A-9701	3	2	1	2	1	1.8
A-5834	1	1	2	4	1	1.8
A-1026	3	3	1	1	1	1.8
T-0850	2	1	1	3	1	1.6

\*Aclaración:

1: percentil <0.25

2: percentil 0.25 a 0.50

3: percentil 0.50 a 0.75

4: percentil >0.75

Las muestras de semen fueron aceptables desde el punto de vista morfológico presentando menos de 30% de anomalías totales y menos 20% de anomalías mayores (de cabeza o pieza media), de acuerdo al criterio de la OEA. Solo un toro (0850) excedió el número de anomalías aceptables y presentó una gran cantidad de cabezas sueltas, lo cual incrementó el número total de anomalías de las muestras. La media de las normalidades totales fue mayor en el semen diluido en T, presentando éste mayor proporción de defectos en cabeza, mientras que menor proporción de defectos localizados en pieza intermedia y cola. Se muestran los resultados de morfología espermática en la tabla 5.

**Tabla 5: Morfología espermática de las muestras de semen descongelado**

Toro	Cabeza anormal [%]	Cabeza desprendida [%]	Pieza intermedia anormal [%]	Gota proximal [%]	Gota distal [%]	Cola doblada [%]	Cola enrollada [%]	Anormalidad des totales [%]	Percentiles para anomalías des totales
A-0850	1.48	17.73	0.49	3.45	2.46	1.48	5.91	33.00*	1
A-0853	4.93	0.94	0.23	2.35	0.94	0.47	2.82	12.68	4
A-1026	4.42	1.20	0.40	2.01	3.21	0.00	2.81	14.05	4
A-1035	10.70	0.67	0.00	8.03	0.33	0.67	5.35	25.75	1
A-3733	4.96	0.35	1.06	1.77	0.00	1.06	4.96	14.16	4
A-5834	8.27	1.08	0.36	1.08	0.72	0.36	2.52	14.39	4
A-9701	10.84	4.43	1.23	2.46	3.20	0.25	1.97	24.38	2
A-9714	10.92	0.52	0.87	1.21	1.39	0.17	2.25	17.33	3
<i>Promedio A</i>	<i>7.07<sup>a</sup></i>	<i>3.37</i>	<i>0.58<sup>b</sup></i>	<i>2.80</i>	<i>1.53</i>	<i>0.56<sup>b</sup></i>	<i>3.57<sup>b</sup></i>	<i>19.47<sup>a</sup></i>	<i>2.88</i>
T-0850	6.82	16.82	0.00	2.73	2.73	0.00	3.18	32.28*	1
T-0853	11.09	2.14	0.19	4.28	0.58	0.00	3.70	21.98	3
T-1026	16.83	0.96	0.19	4.40	0.76	0.00	1.34	24.48	2
T-1035	18.72	1.12	0.00	5.59	0.84	0.28	1.96	28.51	1
T-3733	12.70	2.05	0.00	5.33	0.00	0.41	3.69	24.18	2
T-5834	15.18	1.56	0.39	3.50	0.78	0.00	0.78	22.19	3
T-9701	12.31	5.03	1.01	3.52	0.75	0.00	1.51	24.13	2
T-9714	8.33	2.04	0.34	1.45	0.94	0.34	1.28	14.72	3
<i>Promedio T</i>	<i>12.75<sup>b</sup></i>	<i>3.97</i>	<i>0.27<sup>a</sup></i>	<i>3.85</i>	<i>0.92</i>	<i>0.13<sup>a</sup></i>	<i>2.18<sup>a</sup></i>	<i>24.06<sup>b</sup></i>	<i>2.13</i>

\* Excede el número de anomalías totales admitidas según la OEA  
Diferentes superíndices indican diferencias significativas

En la tabla 6 se muestran los resultados del test hiposmótico a la hora 0, asignando a cada muestra un percentil y ordenados de forma decreciente, según las muestras que obtuvieron mayor valor de HOST(+).

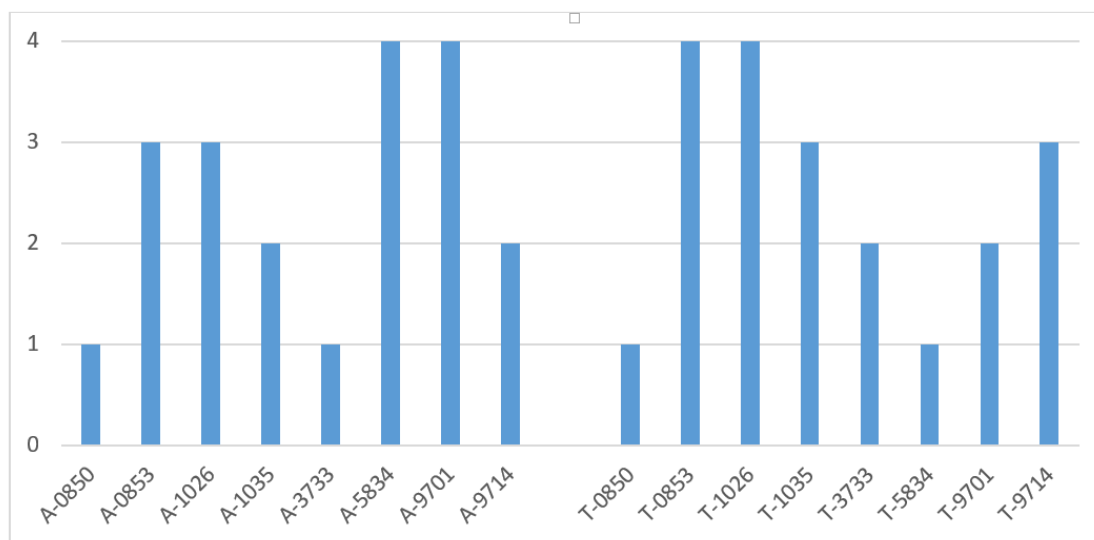


**Tabla 6: Resultados para Test hiposmótico**

Toro	HOST(+) [%]	Percentil
T-1026	34.0	4
A-9701	22.0	4
T-0853	22.0	4
A-5834	21.0	4
T-1035	20.0	3
T-9714	20.0	3
A-0853	17.5	3
A-1026	17.5	3
T-9701	17.0	2
A-9714	16.0	2
T-3733	14.5	2
A-1035	13.0	2
T-0850	11.0	1
T-5834	11.0	1
A-0850	9.0	1
A-3733	8.0	1

- 1: percentil <0.25
- 2: percentil 0.25 a 0.50
- 3: percentil 0.50 a 0.75
- 4: percentil >0.75

No hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las muestras diluidas con A vs. T con respecto a porcentaje de HOST(+) (figura 5).



**Figura 5: Percentiles para HOST**

El índice consensado de los percentiles para los parámetros de cinética VCL, VAP, STR, BCF y WOB respecto a los percentiles para MP presentaron una correlación negativa moderada (-0.62). Los percentiles para HOST(+) respecto a los percentiles para MP tuvieron una correlación lineal positiva moderada (0.5) mientras que los percentiles para los valores de

HOST(+) respecto al índice combinado de los percentiles para los valores de cinética presentaron una correlación negativa débil (-0.28).

Al estudiar los percentiles para el parámetro WOB respecto a los percentiles para morfología normal, se encontró una gran dispersión y una correlación nula (-0.05) entre estas variables (figura 6).

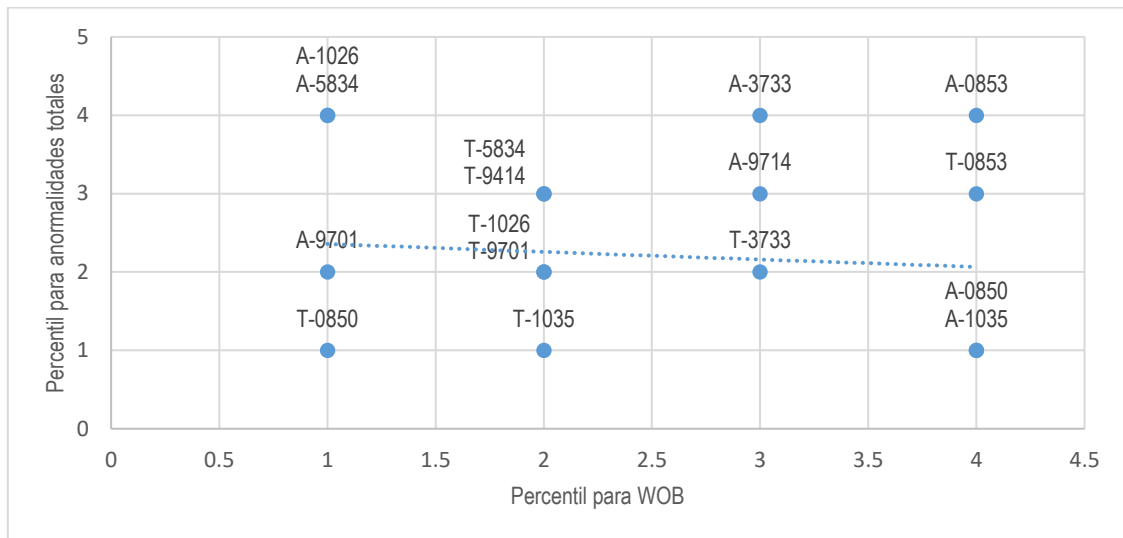


Figura 6: Percentil para anormalidades totales, respecto al percentil para WOB (matriz)

## 6.2. Experimento 2: Fertilización *in vitro*

Al comparar el comportamiento del semen congelado en ambos diluyentes en la FIV, se observó que no hubo diferencias ( $p>0.05$ ) entre ellos en cuanto al clivaje y al desarrollo embrionario en relación a los COC sometidos a maduración.

Al estudiar los toros entre sí encontramos que el toro 5834 tuvo un clivaje mayor respecto al toro 3733 ( $p=0.008$ ), pero no entre estos y el resto de los toros. No hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en desarrollo embrionario entre los 4 toros. Los resultados se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7: Resultados del clivaje y desarrollo embrionario en FIV para el semen congelado de los 4 toros y 2 diluyentes**

Diluyentes	COC	Clivaje*	Clivaje %	DE*	DE/clivados (%)	DE/COC (%)
A	207	143 <sup>a</sup>	69.08	69 <sup>a</sup>	48.25	33.33
T	197	128 <sup>a</sup>	64.97	68 <sup>a</sup>	53.13	34.52
<b>Toros</b>						
1026	109	73 <sup>ab</sup>	66.97	35 <sup>a</sup>	47.95	32.11
3733	92	53 <sup>b</sup>	57.61	30 <sup>a</sup>	56.60	32.61
5834	102	77 <sup>a</sup>	75.49	37 <sup>a</sup>	48.05	36.27
9701	101	68 <sup>ab</sup>	67.33	35 <sup>a</sup>	51.47	34.65

DE: desarrollo embrionario

\*Diferentes superíndices dentro de las columnas indican diferencias significativas ( $p<0.05$ )

### 6.3. Experimento 3: SNP

A partir de la evaluación de los SNPs que se vinculan con la fertilidad de la totalidad de los toros de la reserva (26 toros) en base a su ubicación en los genes candidatos vinculados a la fertilidad *IGF1*, *IGF1R*, *SEPT12*, *CCT6A*, *7SK*, *HS6ST2*, *SFMBT1* y *SOX5*, se pudo observar que el 75% de los genes candidatos seleccionados presentaron variaciones del tipo SNP, salvo los genes *IGF1* y *7SK*. Los 26 SNPs hallados, su localización y frecuencias alélicas y genotípicas, así como el equilibrio de H&W en los SNPs no fijados se muestran en la tabla 8.

Del análisis surge que 14 de los 26 SNPs encontrados (54%) se encuentran fijados con una frecuencia del alelo minoritario menor a 0.05, de los cuales 10 presentan frecuencia =1 (38% del total).

El coeficiente de endogamia arrojó un valor positivo y alto de 0.123, debido en gran parte a la gran proporción de SNPs fijados. 11 de los 12 marcadores no fijados se encuentran en equilibrio H&W ( $p > 0.05$ ) (tabla 8).

**Tabla 8: SNPs encontrados en los genes seleccionados. Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de H&W de los 12 SNPs con alelos no fijados, encontrados en los genes seleccionados**

Gen candidato	Cromosoma	Identificador	Localización	Frecuencia alélica	AF/ANF	Frecuencias Genotípicas y Equilibrio H&W		
<i>IGF1R</i>	BTA21	AX-124388263	7784939	A: 0.46 G: 0.54	ANF	GG=0.31 GA=0.46 AA=0.23 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.13 0.80>p>0.70		
		AX-115113616	7805324	A: 1	AF			
		AX-171452627	7810823	C: 1	AF			
		AX-106723989	7861393	C: 0.58 G: 0.42	ANF	CC=0.42 CG=0.31 GG=0.27 No en equilibrio H&W Chi cuadrado=3.58 0.05>p>0.01		
		AX-106746930	7897243	A: 0.38 C: 0.62	ANF	AA=0.23 AC=0.31 CC=0.46 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=3.21 0.1>p>0.05		
		AX-124350440	7931963	G: 1	AF			
		AX-185116001	7944077	G: 1	AF			
		AX-115109466	8010894	G: 1	AF			
		AX-106721611	8031396	A: 0.62 G: 0.38	ANF	AA=0.44 AG=0.40 GG=0.16 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.44 0.70>p>0.50		
		AX-106748405	8060649	A: 0.81 G: 0.19	ANF	AA=0.65 AG=0.31 GG=0.04 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.003 P>0.95		
		<i>SEPT12</i>	BTA25	AX-106750513	3857054	A: 0.73 G: 0.23	ANF	AA=0.58 AG=0.38 GG=0.04 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.18 0.70>p>0.50
		<i>CCT6A</i>	BTA25	AX-124384139	27736138	C: 0.98 A: 0.02	AF	
<i>HS6ST2</i>	BTX	AX-124383780	16531579	G: 1	AF			
		AX-106741746	16680767	G: 0.96 A: 0.04	AF			
<i>SFMBT1</i>	BTA22	AX-124346986	16780256	T: 1	AF			
		AX-124382519	47983179	T: 0.94 C: 0.06	ANF	TT=0.85 TC=0.11 CC=0.04 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=3.24 0.1>p>0.05		
<i>SOX5</i>	BTA5	AX-106764312	86105025	C: 1	AF			
		AX-106754957	86142655	T: 0.56 C: 0.44	ANF	TT=0.35 TC=0.42		

AX- 106731928	86172885	G: 0.87 A: 0.13	ANF	CC=0.23 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.53 0.50>p>0.30 GG=0.73 AG=0.27 AA=0.00 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.68 0.50>p>0.30
AX- 169380173	86177586	G: 1	AF	
AX- 106736715	86232490	G: 0.69 A: 0.31	ANF	GG=0.50 GA=0.38 AA=0.12 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.24 0.70>p>0.50
AX- 185120971	86338046	G: 1	AF	
AX- 115106941	86392238	C: 0.98 T: 0.02	AF	
AX- 185120972	86442182	G: 0.87 A: 0.13	ANF	GG=0.73 GA=0.27 AA=0.00 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.68 0.50>p>0.30
AX- 115103273	86502735	G: 0.98 A: 0.02	AF	
AX- 106757484	86583204	C: 0.58 A: 0.42	ANF	CC=0.35 CA=0.46 AA=0.19 Si en equilibrio H&W Chi cuadrado=0.08 0.80>p>0.70

---

AF: alelo fijado  
ANF: alelo no fijado

## 7. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados de este estudio, al descongelar y evaluar el semen criopreservado en ambos diluyentes, se encontró una mayor proporción de espermatozoides móviles lentos y móviles locales en los diluidos en T (con yema de huevo) así como mayor BCF, mientras que los criopreservados en A (con lecitina de soja) presentaron mayor VCL. En el resto de parámetros no hubo diferencias al descongelado (h 0). A las 2 h de incubación las muestras de semen diluido en T presentaron mayor disminución de BCF y un aumento mayor en VSL y VAP, indicando un movimiento más rectilíneo que el diluido en A. En el resto de los parámetros de motilidad no hubo diferencias entre A y T a las 2 h de incubación. Estas diferencias moderadas en los patrones de motilidad podrían deberse a diferencias en la viscosidad de los medios de dilución, siendo el T más denso que A y no a distorsiones o daños durante la criopreservación, sin embargo, esta suposición requeriría un análisis más profundo, e involucraría estudiar la densidad de los medios o remover el diluyente previo al análisis en el sistema CASA.

Respecto al efecto de diluyentes con y sin yema de huevo en la calidad del semen posdescongelación en bovinos y ovinos, Aragunde *et al.* (2019) no encontraron diferencias en la motilidad entre las muestras de semen de BCU congeladas en A y T, pertenecientes al banco de semen de este estudio, coincidente con nuestros resultados. Argudo *et al.* (2019) evaluaron en bovinos criollos de los Andes ecuatorianos el efecto de estos diluyentes en algunos parámetros seminales mediante el sistema CASA, concluyendo que la mejor opción de criopreservación era usando de yema de huevo. Carballo *et al.* (2009) y Nuñez y Rubio (2015) estudiaron el efecto de diferentes diluyentes con y sin yema de huevo, concluyendo que los que contenían yema de huevo presentaron mejores resultados a la evaluación posdescongelado, mientras que Galarza (2013) no encontró diferencias significativas entre los dos diluyentes, salvo para la vitalidad espermática; mayor con yema de huevo. Rehman (2012) concluyó que la mejor motilidad posdescongelado, se obtiene con diluyente conteniendo yema de huevo, mientras que al disminuir la concentración de la yema disminuyó la vitalidad y motilidad de los espermatozoides y que la sustitución de la yema con lecitina de soja proporcionó una protección moderada para el semen bovino. Thun *et al.* (2002) llegaron a la conclusión que las muestras de semen procesadas con yema de huevo tuvieron mejor calidad posdescongelado y obtuvieron mejor tasa de no retorno en pruebas de fertilidad *in vivo*. Por el contrario, Aires *et al.* (2003), concluyeron que los diluyentes a base de lecitina de soja presentaron mejor motilidad posdescongelado y mayor porcentaje de preñez en IA, considerándolos de elección en la criopreservación del semen.

En bovinos se considera que la dosis total inseminante para una máxima fertilidad debe tener entre 5 y 20 millones de espermatozoides con MP ya que por debajo de los 5 millones, la fertilidad desciende abruptamente, llegando a partir de los 5 millones a un plateau, en el cual se observa un aumento moderado al aumentar la dosis inseminante, sin embargo, más allá de los 20 millones, por más que se aumente la cantidad de espermatozoides normales con MP no se traduce en un aumento de la fertilidad en los rodeos (Rodríguez-Martínez, 2003). Se acepta que la dosis inseminante mínima por pajuela, para ser aprobada como semen comercial, sea de  $6 \times 10^6$  espermatozoides con MP por pajuela (Sistema de Información sobre Comercio exterior, OEA). De las 16 muestras estudiadas las que cuentan con esta característica (más de  $6 \times 10^6$  espermatozoides con MP) son: T-1026, A-9701, T-9714, A-9714, T-0853, T-9701, A-5834, T-1035, T-3733, A-1026. La MP de las muestras estudiadas es menor a la aceptada (Sistema de Información sobre Comercio exterior, OEA).

Son pocos y poco concluyentes los estudios sobre las características del semen vinculadas a la fertilidad estudiadas de forma objetiva con sistema CASA.

Al estudiar los percentiles para el parámetro WOB respecto a los percentiles para morfología normal, se encontró una gran dispersión y una correlación nula (-0.05) entre estas variables (fig. 1) y dado que los parámetros que se según los reportes se correlacionaron positivamente con una mayor tasa de no retorno en bovinos de carne, fueron morfología y WOB (Morrel *et al.* 2018), se categorizaron las muestras de acuerdo a ambas características. En su estudio, Morrel *et al.* (2018) estudiando los parámetros del semen bovino de razas comerciales continentales y británicas y su correlación con la fertilidad, compararon el semen de 18 toros de razas carniceras y 19 toros de razas lecheras y correlacionaron sus parámetros con la tasa de no retorno en más de 1000 vacas y observaron que los únicos parámetros que se correlacionaron con una mayor tasa de no retorno en bovinos de carne, fueron WOB y morfología ( $r=0.62$  y  $0.57$  respectivamente), mientras que en los bovinos de leche no encontraron ningún parámetro que se correlacione con la fertilidad.

Larsen *et al.* (2000), en humanos, encontraron que los parámetros que más se vinculan a la fertilidad son el número total de espermatozoides viables, así como el porcentaje de espermatozoides móviles y pudieron observar una correlación con la fertilidad en los parámetros de VCL, VAP, STR y BCF, los cuales fueron también estudiados y categorizados en este estudio.

Las muestras de semen fueron aceptables desde el punto de vista morfológico (según criterios establecidos por la OEA), salvo la del toro 0850, diluido tanto en A como en T, que excede al número de anomalías aceptables, debido a que contiene gran cantidad de cabezas sueltas. Esto podría deberse a un reposo sexual prolongado, pero también podría interpretarse



como una manifestación de degeneración testicular temprana (Blom, 1950) o a una debilidad en la adhesión del flagelo (Freneau *et al.*, 2010), lo cual indicaría una patología grave. Sería importante repetir los estudios de espermiograma con muestras seriadas de varios eyaculados de este toro para poder llegar a un diagnóstico preciso.

En todas las muestras estudiadas la MP fue inferior al valor de referencia de la OEA de 30% de MP, no es posible concluir en este estudio si esto pudo deberse a la raza en cuestión o a factores de manejo (del semen y/o animales) ya que el estudio se basó en las existencias de semen congelado en un banco, el cual fue obtenido en el transcurso de distintos años, estaciones y condiciones de manejo, alimentación y reposo sexual diversas. Para poder arribar a conclusiones sería necesario realizar estudios adicionales de semen en BCU. Quezada *et al.* (2016b) estudiaron parámetros reproductivos de toros Criollos Corriente (México) respecto a razas europeas, la MP en el semen de los BC fue similar a las razas europeas, excepto en verano y otoño que fue mejor en los BC.

Los ensayos de FIV constituyen un dato adicional en la evaluación de semen, pudiéndose realizar con ovocitos homólogos o heterólogos (Larson y Miller, 2000; Kruger *et al.*, 1986). La FIV implica la maduración *in vitro* de ovocitos, fertilización y desarrollo de los embriones a etapas transferibles.

Los resultados obtenidos en este trabajo no evidencian diferencias significativas entre los diluyentes en la FIV. No se encontraron estudios que comparen el efecto de los diluyentes en la FIV en razas bovinas. Aires *et al.* (2003) no encontraron diferencias significativas entre ambos diluyentes (con y sin yema de huevo) en la interacción de los espermatozoides bovinos con hemizonas pelúcidas (prueba predictiva de la FIV) pero obtuvieron mayor porcentaje de gestación en animales inseminados con semen diluido sin yema de huevo; a diferencia de los resultados de Üstüner *et al.* (2013) quienes encontraron mejores parámetros de motilidad espermática y mejor desarrollo embrionario en FIV en ovinos en el grupo que contenía yema de huevo.

Dado que en la FIV se utiliza una gran concentración de espermatozoides, con la consiguiente compensación de motilidad y defectos morfológicos, constituye un dato adicional para distinguir el efecto de anomalías no compensables: Espermatozoides capaces de fertilizar al ovocito, pero incapaces de estar implicados en que se desarrolle apropiadamente un embrión (Kastelic, 2013; Saacke *et al.*, 2000). Una fertilidad disminuida en el desarrollo en FIV podría estar dejando en evidencia patologías no compensables del semen, indetectables en los estudios de semen convencionales, el desarrollo embrionario entre toros fue similar, no evidenciando posibles anomalías no compensables.

Todos los toros mostraron una fertilidad *in vitro* acorde a lo esperado y a los resultados históricos del laboratorio con razas comerciales (Filipiak y Larocca, 2012; Filipiak et al. 2017; Larocca y Filipiak, 2017). Las diferencias en el clivaje de dos de los toros, podría sugerir alguna diferencia en la fertilidad entre ambos toros. Existen estudios que correlacionan la fertilidad *in vitro* medida en porcentajes de clivaje y/o en desarrollo embrionario con la fertilidad *in vivo* de los toros y con la tasa de no retorno (Marquant-Le Guienne *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1997; Truelson *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999; Phillips *et al.*, 2004). A pesar de que muchos estudios parecen indicar un efecto paterno en el desarrollo de embriones bovinos, no hay hasta el momento datos concluyentes de esta correlación (Vandaele *et al.*, 2006). Se ha podido distinguir una relación entre el tiempo en que se produce el primer clivaje con respecto a la fertilidad del toro (Ward *et al.*, 2001; Vandaele *et al.*, 2006). Naib *et al.* (2011) encontraron un mayor porcentaje de clivaje en embriones provenientes de semen de toros de alta fertilidad respecto a baja fertilidad, no encontrando un efecto de la fertilidad de los toros con respecto al porcentaje de blastocistos. Si bien las condiciones *in vitro* durante los ensayos no pueden imitar por completo los eventos que se dan en la fertilización de una hembra, en toros de baja fertilidad, las tasas de clivaje *in vitro* tienden a ser menores; del mismo modo, existen diferencias individuales en el comportamiento en la FIV (Eid *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1990). También se ha observado diferencias en porcentajes de desarrollo embrionario, mortalidad embrionaria y preñez en embriones de distintas razas bovinas producidos *in vitro* (Arreseigor *et al.*, 2016a; 2016b; Pontes *et al.*, 2010).

Se ha intentado establecer una relación entre genes o regiones del genoma responsables de variación en la fertilidad de los toros y en los parámetros espermáticos. Se han encontrado estudios recientes que se consideraron de referencia, todos realizados en grandes muestras de toros de raza Holstein (Han y Pañagaricano, 2016; Hering *et al.*, 2014; Suchocki y Szyda, 2015).

Los resultados de nuestro estudio identificaron y estudiaron en las localizaciones seleccionadas 26 SNPs, en localizaciones con alta correlación estadística con fertilidad. Han y Pañagaricano (2016) encontraron en la totalidad del genoma, un total de 349 SNPs con una alta correlación estadística ( $p < 0.01$ ) con la fertilidad de los toros. Sus estudios determinaron regiones del genoma asociados significativamente a la fertilidad, destacando los cromosomas BTA21 y BTA25, regiones que alojan los genes *IGF1R*, *CCT6A*, *SEPT12*, considerados en nuestro estudio con varios SNPs encontrados. Hering *et al.* (2014), estudiaron características del semen (volumen y número total de espermatozoides) de acuerdo a lo cual encontramos 3 SNPs localizados en el cromosoma BTA22 vinculados a estos parámetros. En el año 2016, Hering y Kamiński, comunicaron una vinculación significativa de un polimorfismo del gen *SOX5* (cromosoma BTA5) correlacionados a parámetros de calidad seminal, gen en el cual

nosotros encontramos polimorfismos. Suchoki y Szyda (2015) observaron más de 40 SNPs vinculados a parámetros seminales, determinando que los más importantes se encontraban en el cromosoma BTA10 (gen *7SK*) para motilidad seminal y en el cromosoma BTX (gen *HS6ST2*) para concentración.

De los 26 SNPs encontrados, más de la mitad (54%) estaban fijados (con una frecuencia del alelo minoritario menor a 0.05) de los cuales 10 presentaban frecuencia =1 (38% del total). Esto podría responder a que los animales a excepción de uno provienen de una población cerrada, que ha permanecido aislada durante varias décadas, así como a características propias de los BCU, pudiendo haber alelos poco comunes para la raza. La identificación de SNPs en genes candidatos para fertilidad es importante, ya que este tipo de marcadores codominantes, presentan tasas de mutación bajas, por lo que disminuye la posibilidad de introducir errores en la estimación de los parámetros poblacionales, obteniéndose resultados reproducibles y comparables con otras poblaciones (Coates *et al.*, 2009)

El valor de  $F_{is}$  fue alto y positivo, lo que se podría relacionar con un elevado coeficiente de consanguinidad, pero dado que es una muestra reducida y no representativa de la población y que los SNPs estudiados fueron detectados en otras razas, no se pueden extraer conclusiones con respecto a toda la población. Serían necesarios análisis de más individuos para ello. De todas formas, es posible y esperable que en una población cerrada exista un alto porcentaje de marcadores fijados. La mayoría de los marcadores estaban en equilibrio H&W, lo cual puede ser indicio de ausencia de selección.

Sería de interés profundizar este estudio aumentando la muestra poblacional y realizar un análisis de variabilidad poblacional utilizando parámetros de diversidad genética como los estadísticos  $F$  de Sewall Wright para explicar el comportamiento de estos SNPs en la población de BCU. Debemos tener en cuenta que estos son los primeros trabajos analizando estos SNPs en BCU, no encontrando referencias bibliográficas en poblaciones de bovinos criollos sobre los mismos.

Si bien no es posible mediante este análisis determinar el impacto de estos SNPs en la fertilidad o características seminales, debido al tamaño de la muestra, es interesante conocer estos aspectos genéticos ya que un total de 26 toros constituyen la totalidad de toros de la reserva siendo a su vez progenitores y propagadores de genes para las próximas generaciones de BCU. A su vez podría ser interesante realizar análisis comparativos con otras poblaciones bovinas del país o región.

## 8. CONCLUSIONES

Las muestras de semen estudiadas presentan una calidad espermática cuestionable, dados sus valores de motilidad progresiva, solo 10 de las 16 muestras, contienen una dosis inseminante adecuada, con resultados similares de motilidad y HOST para ambos diluyentes (A y T), al tiempo que en un sistema FIV (4 toros, 2 diluyentes) tuvieron fertilidad similar y adecuada en todos los casos.

El semen podría ser utilizado para IA u otras biotecnologías reproductivas (no comercialmente) en el marco de los esfuerzos conservacionales de la raza, salvo el semen de uno de los toros, que presentó problemas graves en la morfología espermática.

En la población estudiada (26 toros) se identificaron 26 polimorfismos tipo SNPs en 6 genes vinculados a fertilidad (IGF1R, SEPT12, CCT6A, HS6ST2, SFMBT1 y SOX5) de los cuales el 54% resultaron fijados, esto podría deberse a que nos encontramos con una población cerrada desde el punto de vista genético con características raciales propias.

## 9. CONSIDERACIONES FINALES

Este proyecto abordó la temática de BCU ya que en el momento es considerada una raza en peligro de extinción dada la única reserva de ~600 animales. Mantener la biodiversidad es una responsabilidad por parte de los países y la Universidad cumple un rol fundamental. A partir de la existencia del banco de semen de estos animales, nos embarcamos en el estudio del semen almacenado y en estudios poblacionales de marcadores genéticos asociados a fertilidad.

Dado que no hay antecedentes de FIV con semen de BCU criopreservado en dos diluyentes, este estudio resulta un aporte al conocimiento y uso de biotecnologías reproductivas para la conservación de esta raza, al tiempo que ayuda a conocer la calidad del banco de semen de BCU. Pudimos también evaluar el efecto de los diluyentes (Andromed y Triladyl). Todo esto nos permitió conocer el material con que se cuenta, el cual consideramos de capital importancia en la consecución de los objetivos conservacionales de la raza y para la ampliación futura del banco y la aplicación de biotecnologías reproductivas.

Al contrario de la hipótesis planteada, el semen criopreservado de toros BCU no presenta una buena calidad espermática dada su baja dosis inseminante en 6 de las 16 muestras estudiadas y su baja MP en todas las muestras, sin perjuicio de lo cual su capacidad fertilizante *in vitro* resultó similar a los resultados de nuestro Laboratorio con razas comerciales y es similar al congelar el semen en ambos diluyentes. Sería de interés profundizar los estudios del semen

de BCU con el fin de conocer el motivo de la baja MP, si pudo deberse a un efecto de la raza o a circunstancias en el manejo de los animales y/o del semen o durante la criopreservación.

Este proyecto sienta las bases para poder continuar los trabajos de extracción y criopreservación de semen para la aplicación del banco y para la producción de embriones BCU, ya sea mediante transferencia de embriones o FIV, siendo una primera experiencia en este sentido, además de brindar un mejor conocimiento del semen que está disponible actualmente para tales fines.

También hemos estudiado marcadores moleculares vinculados a la fertilidad encontrando gran cantidad de SNPs (26) en los genes seleccionados. Conocer la variación de SNP vinculados a fertilidad en los 26 toros existentes de la reserva, ha resultado de interés, dado que estos son los únicos progenitores y propagadores de genes para las próximas generaciones de BCU, permitiendo también realizar estudios de variabilidad genética para estas características. Sería de interés profundizar este estudio aumentando la muestra poblacional y realizar un análisis de variabilidad poblacional. A su vez podría ser interesante realizar análisis comparativos con otras poblaciones bovinas del país o región.

## **10. RECONOCIMIENTOS**

Agradecemos la financiación de la CSIC, Udelar, al Proyecto de Investigación y Desarrollo (I+D), id 508. Evaluación reproductiva, creación de un banco de germoplasma y relevamiento poblacional de bovinos y cerdos Criollos del Uruguay (2016).

Al Programa de Proyectos CIDEDEC, Facultad de Veterinaria (2019).

Al Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil (PAIE, CSIC) (2019).

Al Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria, Uruguay.

## 11. LITERATURA CITADA

- Aguilar, G.F., K.K. Amaro, G. Hernández, F. Fernández Reyes. 2013. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen ovino: yema de huevo, lecitina de soya. División: Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. México.
- Aires, V., K. Hinsch, S. Mueller-Schloesser, E. Bogner. 2003. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithinbased extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriog.* 60(2): 269-79.
- Amann, R.P., D. Walberski. 2014. Computer-assited sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriog.* 81: 5-17.
- Amann, R.P., J.M. DeJarnette. 2012. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. Review. *Theriog.* 77:795– 817.
- Amann, R.P., S.P.S. Gill. 2000. Correlation or diagnosis and prediction? Proc. 14th ICAR, Stockholm 1, 69 (2: 3).
- Andrabi, S. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 44(3):552-569.
- Ansari M.S., B.A. Rakha, S.M. Andrabi, S. Akhter. 2011. Effect of straw size and thawing time on quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Reprod. Biol.* 11(1):49-54.
- Aragunde, R., D. Fila, J.C. Boggio Devincenzi, E. Armstrong, S. Llambí. 2019. Caracterización de la criopreservación de semen de Bovinos Criollo Uruguayo. X Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria y XII Simposio REDBIO Argentina. REDBIO. 12-15 de noviembre de 2019, Uruguay.
- Armstrong E., A. Iriarte, A.M. Martínez, M. Feijoo, J.L. Vega-Pla, J.V. Delgado, A. Postiglioni. (2013). Genetic diversity analysis of the Uruguayan Creole cattle breed using microsatellites and mtDNA markers. *Genet Mol. Res.*12 (2): 1119-1131.
- Armstrong, E., F. Peñagaricano, R. Artigas, L. De Soto, C. Corbi, S. Llambí, G. Rincón, A. Postiglioni. (2011). Marcadores moleculares asociados al veteado de la carne en bovinos Criollos Uruguayos. *Arch. Zootec.* 60(231): 707-716. 2011.
- Armstrong, E. y A. Postiglioni. 2010. Bovinos y ovinos Criollos del Uruguay. Estudios y perspectivas. *Agrociencia* 14(3): 33-41.

- Armstrong E., A. Postiglioni, A. Martínez, G. Rincón, J.L. Vega-Pla. (2006). Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*). Genet Mol. Biol. 29, 2, 267-272.
- Argudo, D., D. Galarza, P. Bueno, C. Iñiguez, S. Méndez, M. Soria, C. Torres, F. Perea, R. Alberio. 2019. Methods of collection, extender type, and freezability of semen collected from creole bulls raised in the tropical highlands of Ecuador. Trop. Anim. Health. Prod. 51(7): 1839-1845.
- Arreseigor C.J., Y. Filipiak, A.R. Pereira, A.E. Arreseigor, K. Avelino, A.B. Ibarreche, A.C. Maraia, J. Paredes. 2016a. Pregnancy rates from different cattle breed embryos produced in vitro in a commercial program (part 1). Congreso de AETE (European Embryo Transfer Association).
- Arreseigor C.J., Y. Filipiak, A.R. Pereira, A.E. Arreseigor, K. Avelino, A.B. Ibarreche, A.C. Maraia, J. Paredes. 2016b. Embryo mortality from different cattle breed embryos produced in vitro in a commercial program (part 2). Congreso de AETE (European Embryo Transfer Association).
- Asociación Rural del Uruguay. 2019. Ganado criollo ingresó al libro de registros genealógicos. Ganadería, Revista de la Asociación Rural del Uruguay. N° 213.
- Grisolía, S.; P. Puigdomènech, F. J. Ayala. 2003. Genética. Barcelona: Nuevas Ediciones de Bolsillo. 192 p. ISBN 978-84-9759-560-5.
- Boggio Devincenzi, J.C., D. Fila, R. Aragunde, E. Armstrong, G. Datelle, G. Mérola. 2019. Estudios reproductivos en toros raza Criollo Uruguayo. Evaluación de aptitud reproductiva potencial, circunferencia escrotal y tono testicular. Primer reporte en Uruguay. X Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria y XII Simposio REDBIO Argentina. REDBIO. 12-15 de noviembre de 2019, Uruguay.
- Blom, E. 1950. Interpretation of spermatid cytology in Bulls. Fertil. Steril. 1(3): 223-238.
- Callen, D., A. Thompson, Y. Shen, H. Phillips, R. Richards, J. Mulley, G. Sutherland, 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. American Journal of Human Genetics 52: 922-927.
- Carballo, D., R. Canseco, R. García, F. Montiel. 2009. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano.
- Coates B.S., D.V. Sumerford, N.J. Miller, K.S. Kim, T.W. Sappington, B.D. Siegfried. 2009. Comparative Performance of Single Nucleotide Polymorphism and Microsatellite Markers for Population Genetic Analysis. J. Hered. 100(5): 556-564.

- Cormier, N., M.A. Sirard, J.L. Bailey. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.* 18: 461–468.
- Chenoweth, P.J. Semen quality assessment. 2002. Proceedings, The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Workshop, September 5-6, 2002, Manhattan, Kansas. College of Veterinary Medicine, Kansas State University.
- Dhami A.J., V.R. Jani, G. Mohan, K.L. Sahni. 1994. Effect of extenders and additives on freezability, post-thaw thermoresistance and fertility of frozen Murrah buffalo semen under tropical climate. *Buffalo J.* 10: 35–45.
- Eid L.N., S.P. Lorton, J.J. Parrish, 1994. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol. Reprod.* 51: 1232–1237.
- FAO, 2012. Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines, no12, Roma.
- Filipiak, Y.; C. Larocca, & M. Martínez, 2017. Comportamiento del semen bovino sexado congelado-descongelado en fertilización *in vitro* (FIV) Capacitado Mediante BO en dos Concentraciones versus Percoll. *Int. J. Morphol.*, 35(4): 1337-1341.
- Filipiak, Y., C. Larocca. 2012. Utilización del azul tripán para diferenciar ovocitos bovinos vivos y muertos en fertilización *in vitro*. *Arch. Zootec.* 61(234): 309-312.
- Fiser P.S., R.W. Fairfull. 1986. The effect of rapid cooling (cold shock) of ram semen photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiol.* 23(6): 518-524.
- Freneau, G.E., P.J. Chenoweth, R. Ellis, G. Rupp. 2010. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Anim. Reprod. Sci.* 118: 176-181.
- Fukui Y, H Kohno, T. Togari, M. Hiwasa, K. Okabe. 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean based semen extender in sheep. *J Reprod Dev.* 4(4): 286-289.
- Galarza, A. 2013. Eficacia de dos diluyentes: tris + lecitina de soya (Andromed®) y tris + yema de huevo (Triladyl ®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca-Ecuador. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca, Ecuador.
- García Vera, W.C. 2014. Optimización de los protocolos de criopreservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranosa. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Veterinària.
- Han, Y. and Peñagaricano, F. 2016. Unravelling the genomic architecture of bull fertility in Holstein cattle. *BMC Genet* 17:143.
- Hering, D.M., K. Olenski, S. Kaminski. 2014a. Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein-Friesian Bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 146:89–97.



- Hering, D.M., K. Olenski, A. Rusc, S. Kaminski. 2014b. Genome-wide association study for semen volume and total number of sperm in Holstein-Friesian Bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 151(3-4):126-30.
- Hummersted, R.H., J.K. Graham, J.P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.* 11(1): 73-88.
- IETS. 2013. Manual of the International Embryo Transfer Society. A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. Fourth edition.
- Kastelic, J.P., J.C. Thundathil. 2008. Breeding Soundness Evaluation and Semen Analysis for Predicting Bull Fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 43(2): 368–373.
- Kastelic, J.P. 2013. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. *Anim. Front.* 3(4): 20-25.
- Koziol, J.H., C.L. Armstrong. 2018. Society for Theriogenology Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls. Second Edition.
- Kruger, T.F., R. Menkveld, F. Stander, C.J. Lombard, J.P. Van der Merwe, J. Van Zyl, K. Smith. 1986. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 46(6): 1118-1123.
- Lacadena, J. 1981. Genética. 3ª Edición. A.G.E.S.A. Madrid.
- Larocca, C., Y. Filipiak. 2017. Semen bovino sexado congelado-descongelado en producción de embriones *in vitro*. *Int. J. Morphol.*, 35(1): 371-375.
- Larsen, L., T. Scheike, T.K. Jensen, J.P. Bonde, E. Ernst, N.H. Hjollund, Y. Zhou, N.E. Skakkebaek, A. Giwercman. 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reprod.* 15(7): 1562-1567.
- Larson, J.L., D.J. Miller. 2000. Can relative spermatozoa galactosyltransferase activity be predictive of dairy bull fertility? *J. Dairy Sci.* 83: 2473–2479.
- Liebfried, L., N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 48:76-86.
- Lozano, H. 2009. Factores que afectan la calidad seminal en toros. *Rev. Med. Vet Zoot.* 56: 258-272.
- Llambí, S. y E. Armstrong. 2016. Evaluación reproductiva, creación de un banco de germoplasma y relevamiento poblacional de bovinos y cerdos Criollos del Uruguay. Proyecto de Investigación y Desarrollo CSIC, id. 508, llamado 2016. Facultad de Veterinaria, Udelar. Montevideo, Uruguay.

- Marquant-Le Guienne, B., P. Humblot, M. Thibier, C. Thibault. 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev* 30: 259–266.
- Mellisho, E. 2010. Evaluación seminal de calidad seminal. *Manual de Laboratorio de Reproducción Animal*, 7.
- Mendoza J., P. Dulin, T. Warrant. 2000. The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature. *Cryobiol.* 41(4):319-23.
- Minitube 2018a. Andromed®. Egg yolk free medium for bull semen. Disponible en: [https://www.minitube.com/pdf/index/13503-0200\\_Leaflet-AndroMed\\_en\\_181002.pdf](https://www.minitube.com/pdf/index/13503-0200_Leaflet-AndroMed_en_181002.pdf) [consulta: 23/11/2020].
- Minitube 2018b. Triladyl® & Biladyl®. Extender concentrates for preparation of egg yolk containing media for bull semen freezing. Disponible en: <https://www.minitube.com/products/bovine/semen-extenders/triladyl-250-g> [consulta: 23/11/2020].
- Montenegro, MC. 2012. Caracterización genética de los cerdos Pampa Rocha de Uruguay. Tesis-Maestría en Ciencias Biológicas Subárea Genética-PEDECIBA. Uruguay.
- Morrel, J.M., A.S. Valeanu, N. Lundeheim, A. Johannisson. 2018. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Vet Scand.* 60: 41.
- Muñoz, R., C. Tamargo, C.O. Hidalgo, A.I. Peña. 2007. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim. Reprod. Sci.* 109(1-4): 27-39.
- Naib, A., J.P. Hanrahan, P. Lonergan, S., Fair. 2011. *In vitro* assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriog.* 76: 161-167.
- National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Polimorfismos-de-nucleotido-%C3%BAnico> [consulta 11/12/2020]
- Núñez, A.L., A.A. Rubio. 2015. Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa, Andromed y Continental *one step*. Tesis de grado. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras.
- Organización de los Estados Americanos (OEA). Mercado Común del Sur (MERCOSUR) Resoluciones del Grupo Mercado Comun MERCOSUR/GMC/RES N° 46/96: Marco regulatorio para el tratamiento de la genética animal de bovinos, caprinos, ovinos, équidos y porcinos en el Mercosur <http://www.sice.oas.org/Trade/MRCSRS/Resolutions/RES4696.asp> [consulta: 06/05/2021]

- Oliveira Moura, L.C., M. Corona Da Silva, P. Pereira das Neves Snoeck. 2010. Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. *Rev. Bras. Med. Vet*, 32(3): 146-150.
- Phillips, N.J., M.R. McGowan, S.D. Johnston, D.G. Mayer. 2004. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Anim. Reprod. Sci.* 81: 47–61.
- Pontes J.H., K.C. Silva, A.C. Basso, A.G. Rigo, C.R. Ferreira, G.M. Santos, B.V. Sanches, J.P. Porcionato, P.H. Vieira, F.S. Faifer, F.A. Sterza, J.L. Schenk, M.M. Seneda. 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriog.* 74:1349 –1355.
- Primo, A.T. 1992. El ganado bovino ibérico en las américas: 500 años después. *Arch. Zootec.* 41: 421-432.
- Quezada-Casasola, A., L.V. Beltrán-Prieto, U. Macías-Cruz, L. Avendaño-Reyes, J.A. Ramírez-Godínez. 2016. Comparison of equine chorionic gonadotropin (eCG) and oestradiol cypionate administered 24 h after CIDR removal during an *oestrus* synchronization protocol for artificial insemination in Mexican Criollo cattle. *Veterinarski Arhiv.* 86(3), 437-451.
- Quezada-Casasola A., K.E. Martínez-Armendáriz, J.M. Carrera-Chávez, E. Pérez-Eguía, C.A. Rodríguez-Alarcón, L. Avendaño-Reyes. 2016. Effect of season on scrotal circumference, semen characteristics and testosterone serum concentration in Mexican Corriente and other beef breed bulls. *Anim. Reprod.* 13(4):787-794.
- Quezada-Casasola, A., L. Avendaño-Reyes, U. Macías-Cruz, J.A. Ramírez-Godínez, R.R. Rivas-Cáceres. 2015. Estrous behavior, ovulatory follicle dynamics, and *corpus luteum* size in Creole cows after spontaneous or prostaglandin F2 $\alpha$ -induced estrous. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 28:303-312.
- Quezada-Casasola, A., L. Avendaño-Reyes, U. Macías-Cruz, J. Alejandro Ramírez-Godínez, A. Correa-Calderón. 2014. Estrus behavior, ovarian dynamics, and progesterone secretion in Criollo cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:675–684.
- Quezada-Casasola, A., A. Correa-Calderón, L. Avendaño-Reyes, J. A. Ramírez-Godínez, U. Macías-Cruz. 2013. Behavioural, follicular and hormonal characteristics of the oestrous cycle of Mexican Criollo cattle. *Anim, Prod. Sci.* 54(3)277-284.
- Quezada-Casasola A., L. Avendaño-Reyes, J.A. Ramírez-Godínez, J.R. Núñez-Cuesta, F.J. Carlos-Pérez, G. Mena-Ortíz, K. Siqueiros. 2012. Effect of phase of *estrous* cycle and fixed-timed insemination on fertility of Criollo cows after a norgestomet or progesterone based treatment. *J. Anim. Sci.* 90(3) and *J. Dairy Sci.* 95(2): 321-322.

- Rehman, F.U. 2012. Substitution of animal protein source with plant protein in semen extenders of various cattle breeds. Tesis de Master of Science (Hons) in Livestock Management. Livestock Management Department, Khyber Pakhtunkhwa Agricultural University, Peshawar-Pakistan.
- Rodríguez-Martínez, H. 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia? *Reprod. Dom. Anim.* 38: 312–318.
- Rodríguez, M., G. Fernández, C. Silveira, J.V. Delgado. 2001. Estudio étnico de los bovinos criollos del Uruguay: I. Análisis biométrico. *Arch. Zootec.* 50: 113-118.
- Saacke, R.G., J.C. Dalton, S. Nadir, R.L. Nebel, J.H. Bame. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 663-667.
- Spitzer, J.C., F.M. Hopkins, P.J. Chenoweth. 2011. New guidelines for breeding soundness evaluation (BSE) of bulls. Beef Cattle Information, Clemson University Cooperative Extension. Disponible en: [http://media.clemson.edu/public/extension/beef\\_cattle/bc\\_2011.pdf](http://media.clemson.edu/public/extension/beef_cattle/bc_2011.pdf) [Consulta: 27/07/2020]
- Salomon, S., W. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37(3–4): 185-249.
- Shi, K.S., K.H. Lu, I. Gordon. 1990. Effect of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. *Theriog.* 33: 324.
- Suchocki, T. and J. Szyda. 2015. Genome-wide association study for semen production traits in Holstein-Friesian Bulls. *J. Dairy Sci.* 98(8):5774-5780.
- ThermoFisher Scientific. Invitrogen™ MagMAX™ DNA Multi-Sample Kit Catalog number: 4413020. <https://www.thermoFisher.com/order/catalog/product/4413020#/4413020> [consulta: 11/12/2020]
- ThermoFisher Scientific. Applied Biosystems™ Axiom™ Bovine Genotyping v3 Array (384HT format) Catalog number: 551089. <https://www.thermoFisher.com/order/catalog/product/551089#/551089> [consulta: 11/12/2020]
- Thun, R., M. Hurtado, F. Janett. 2002. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriog.* 57: 1087-1094.
- Thundathil J.C., L. Alysha, L. Dance, J.P. Kastelic. 2016. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriog.* 86(1): 397-405.

- Trimeche, A., J. Yvon, M. Vidament, E. Palmer, M. Magistrini. 1999. Effects of glutamine, proline, histidine, and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriog.* 52(1): 181-91.
- Truelson, S.L., J.K. Graham, R.G. Mortimer, T.G. Field. 1996. *In vitro* penetration into bovine oocytes and zona-free hamster oocytes by bull spermatozoa treated with liposomes. *J. Dairy Sci.* 79:991-999.
- Üstüner, B., S. Alcay, Z. Nur, H. Sagirkaya, M.K. Soylu. 2013. Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in post-thaw ram semen quality and *in vitro* fertility. *Kafkas Univ. Vet Fak. Derg.* 20(3): 393-398.
- Vanadaele, L., B. Mateusen, D. Maes, A. De Kruif, A. Van Soom. 2006. Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility? *Theriog.* 65: 1691-1703.
- Valverde, A., M. Madrigal-Valverde. 2018. Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal I. *Agronomía Mesoamericana* 29(2). Universidad de Costa Rica.
- Van Wagendonk-de Leeuw, A., R. Haring, L. Kaal-Lansbergen, J.H. Den Daas. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriog.* 54(1): 57-67.
- Verde, O. 2019. Caracteres reproductivos a considerar en un programa de evaluación genética para bovinos de carne. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay. [https://www.researchgate.net/publication/266499734\\_caracteres\\_reproductivos\\_a\\_considerar\\_en\\_un\\_programa\\_de\\_evaluacion\\_genetica\\_para\\_bovinos\\_de\\_carne](https://www.researchgate.net/publication/266499734_caracteres_reproductivos_a_considerar_en_un_programa_de_evaluacion_genetica_para_bovinos_de_carne) [consulta: 23/11/2020].
- Vergara, O., M. Cerón, N. Hurtado, E. Arboleda, J. Granada, C. Rúa. 2008. Estimación de la heredabilidad del intervalo de partos en bovinos cruzados. *Rev. MVZ. Córdoba* 13(1):1192-1196.
- Ward, F., D. Rizos, D. Corridan, K. Quinn, M. Boland, P. Lonergan. 2001. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 47-55.
- Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.
- Woelders, H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *The Veterinary Quarterly* 19(3):135-8.

- Zhang, B.R., B. Larsson, N. Lundeheim, M.G. Haard, H. Rodriguez-Martinez. 1999. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *Int. J. Androl.* 22: 253–260.
- Zhang, B.R., B. Larsson, N. Lundeheim, H. Rodriguez-Martinez. 1997. Relationship between embryo development *in vitro* and 56-day non return rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriog.* 48: 221–231.

## 12. ANEXOS

### 12.1. Artículo publicado en los Archivos Latinoamericanos de Producción Animal (ALPA)



Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 2020. 28 (3-4)

#### Calidad y capacidad fertilizante *in vitro* de semen de toros Criollo Uruguayo criopreservado en dos diluyentes comerciales

Yael Filipiak<sup>1</sup>, Eileen Armstrong<sup>2</sup>, Rafael Aragunde, Danilo Fila, Jorge Gil Laureiro, Valentina Álvarez, Marcos Pereira, Juan Carlos Boggio Devicenzi, Clara Larocca, Fernando Vila, Silvia Llambi  
Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Lasplacas 1620, Montevideo, Uruguay.

#### Quality and *in vitro* fertility of Uruguayan Criollo bulls' semen cryopreserved in two commercial diluents

**Abstract.** The quality and *in vitro* fertility (IVF) of semen from the Uruguayan Criollo cattle bank of the Veterinary Faculty were evaluated. Semen from 8 bulls, diluted in Triladyl® (T) and Andromed® (A) (with/without egg yolk) was evaluated by CASA: concentration, motility, kinetics, morphology and performed a hypoosmotic swelling test. After 2h motility and kinetics were repeated. T-test for time and diluents was applied and percentiles to categorize the 16 groups. 404 bovine A-quality oocyte-cumulus complexes (OCC) obtained from ovaries from a slaughterhouse, were matured in TCM with 5 % BCS and hormones, in drops covered with mineral oil, at 38.5 °C, 5 % CO<sub>2</sub> and saturated humidity. After 22h were inseminated with selected semen of 4 bulls in A and T, which was selected by centrifugation in Percoll® gradients (90/45 %), in Talp-Sperm and adjusted with Talp-Fert to 2x10<sup>6</sup> sperm/ml, drops covered with mineral oil were formed and placed the OCC inside, 18h. The zygotes were denuded and cultured in CR1aa with BCS (5 %). The cleavage (48h) and embryo development (ED) on day 7 (IETS standards), were evaluated. Results were analyzed by Chi square. There were no significant differences in cleavage between diluents (A:143/207; T:128/197), nor ED (33.33 and 34.52 % respectively). There were no significant differences in cleavage between the 1026 (73/109) bull's semen and 9701 (68/101), nor between them and 5834 (77/102) and 3733 (53/92); although, 5834 had higher cleavage rate than 3733 (p= 0.008). There were no significant differences in ED between bulls. Except for bull 0850 (A and T), the others were acceptable and were fertile *in vitro* frozen both in A and T. This work assessed the quality of the semen bank and its *in vitro* fertilizing capacity. Both diluents resulted suitable. Except the semen samples from one bull, the rest could be used for other reproductive biotechnologies.

**Key words:** Uruguayan Criollo Cattle, *In vitro* fertilization, CASA, semen bank.

## **12.2. Publicaciones en Congresos**

### 12.2.1. International Congress on Animal Reproduction (ICAR) (2021)

In vitro fertility of semen frozen in two commercial extenders of a uruguayan creole bovine semen bank.

Filipiak Y., E. Armstrong, R. Aragunde, D. Fila, J. C. Boggio Devincenzi, C. Larocca, V. Álvarez, M. Pereira, S. Martínez, D. Lombardo, H. Cisale, P. Torres, A. Maruri, F. Vila, S. Llambí.

Fue presentado y aceptado sin modificaciones para el Congreso en el año 2020, sin embargo, por motivo de la pandemia de Covid-19, el Congreso se pospuso para el año 2021. El trabajo fue reenviado y está nuevamente en proceso de evaluación.



Embryogenesis in vitro

## IN VITRO FERTILITY OF SEMEN FROZEN IN TWO COMMERCIAL EXTENDERS OF A URUGUAYAN CREOLE BOVINE SEMEN BANK

Y. Filipiak<sup>3</sup>, E. Armstrong<sup>5</sup>, R. Aragunde<sup>4</sup>, D. Fila<sup>4</sup>, J.C. Boggio Devincenzi<sup>4</sup>, C. Larocca<sup>4</sup>, V. Álvarez<sup>4</sup>, M. Pereira<sup>4</sup>, S. Martínez<sup>4</sup>, D. Lombardo<sup>2</sup>, P. Torres<sup>2</sup>, H. Cisale<sup>2</sup>, A. Maruri<sup>2</sup>, F. Vila<sup>1</sup>, S. Llambí<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Biostatistics and Informatics, Faculty of Veterinary, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>INITRA, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup>Unit of Animal Reproduction, Animal Production Department, Faculty of Veterinary, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

<sup>4</sup>Unit of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

<sup>5</sup>Unit of Genetics and Animal Improvement, Animal Production Department, Faculty of Veterinary, University of the Republic, Montevideo, Uruguay

### BACKGROUND-AIM

Conservation of local zoogenetic resources must include an ex-situ plan. Our Faculty has got a semen bank of ~800 straws of 12 bulls of the only reserve of Uruguayan Creole (UC) cattle. In order to prevent the lethal effects of cold shock in cryopreserved semen, some extenders have egg yolk (Triladyl) and some vegetal lecithin instead (Adromed). We evaluated the in vitro fertility (IVF) of semen of 4 UC bulls, frozen in 2 extenders.

### METHODS

Individual motility and concentration of different straws were subjectively studied. 404 Oocyte-cumulus complexes (OCC), obtained from slaughterhouse ovaries, were matured in 100 $\mu$ l drops of TCM-199 + FBS + hormones, 15 OCC/drop, covered with mineral oil, 22h at 38.5°C, 5%CO<sub>2</sub> and 95% humidity. After maturation, 8 groups were formed and inseminated with semen of 4 bulls, frozen in both extenders, andromed (A) and Triladyl (T): 1A; 1T; 2A; 2T; 3A; 3T; 4A and 4T. The capacitation was performed using Percoll gradients in Talp-Sperm and adjusted to 2x10<sup>6</sup> spz/ml with Talp-Fert. 100 $\mu$ l drops were formed, covered with mineral oil and the matured oocytes were placed in and co-cultured, 5h. The gametes were denuded by vortex and cultured in CR1aa + 5% FBS, in drops, in incubator. At 48h, division rate (DR) was evaluated, on day 7 embryonic development (ED) (IETS standards). The results were analyzed with  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ).

### RESULTS

The straws of the different treatments had a concentration of 30-40 million/straw of 0.5ml, individual motility of 1A, was 30%; 1T, 50%; 2A, 20%; 2T, 30%; 3A, 30%; 3T, 30%; 4A, 70% and 4T, 50%. There were no significant differences in DR between 1 (73/109) and the 4 bull (68/101) ( $p > 0.05$ ), neither between them and bull 3 (77/102) and 2 (53/92). However, the 3 showed a greater DR with respect to the 2 ( $p = 0.008$ ). There were no significant differences in ED between the 4 bulls (35; 30; 37 and 35, respectively) ( $p > 0.05$ ). Comparing the behavior of the extenders, we found that did not have differences among them in DR (A: 143/207; B: 128/197), nor ED (69 and 68 respectively) ( $p > 0.05$ ).

### CONCLUSIONS

This work is the first one studying the UC semen in IVF, frozen in 2 extenders, performing a good behavior in DR and ED and provided a better knowledge of the IVF of the UC semen bank.

## 12.2.2. REDBIO

Fertilidad in vitro de semen de Bovinos Criollo Uruguayo congelado en dos diluyentes comerciales.

Filipiak Y., D.E. Fila, R. Aragunde, E.M. Armstrong, J.C. Boggio Devincenzi, C.E. Larocca, M.S. Martínez, V. Álvarez, J.M. Pereira, F. Vila, M.S Llambí

Presentación en formato Poster y de forma Oral como trabajo destacado en el X Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria y XII Simposio REDBIO Argentina. Radisson Victoria Plaza, Montevideo, Uruguay. 12 al 15 de noviembre de 2019.



Certificamos por parte del Comité Organizador y Comité Científico del X Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria y XII Simposio REDBIO Argentina, llevado a cabo en el Radisson Victoria Plaza Hotel, Montevideo, Uruguay, del 12 al 15 de noviembre del corriente año, hemos recibido la presentación que a continuación detallamos

### Título:

**Fertilidad in vitro de semen de Bovinos Criollo Uruguayo congelado en dos diluyentes comerciales**

### Autores:

Filipiak Y., Fila D.E., Aragunde R., Armstrong E.M., Boggio Devincenzi J.C., Larocca C.E., Martínez M.S., Álvarez V., Pereira J.M., Vila F., Llambí M.S



  
Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza Vilaró  
Presidente Congreso REDBIO

  
Ing. Agr. PhD. Juan Izquierdo  
Vicepresidente Congreso REDBIO



Fertilidad in vitro de semen de Bovinos Criollo Uruguayo congelado en dos diluyentes comerciales.

Filipiak Y., Fila D.E., Aragunde R., Armstrong E.M., Boggio Devincenzi J.C., Larocca C.E., Martínez M.S., Álvarez V., Pereira J.M., Vila F., Llambi M.S.

Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo, Uruguay

Autora que presentará el trabajo en el evento: Silvia Llambi

silvia.llambi@gmail.com

Tema: Biotecnología animal

En la Facultad de Veterinaria existe un banco de semen (Proyecto I+D, 2016, con más de 800 pajuelas), de la única reserva de bovinos Criollo Uruguayo (BCU). Se presentan resultados preliminares del estudio cuyo objetivo es evaluar la fertilidad in vitro de semen de cuatro toros congelado en dos diluyentes. 122 complejos cúmulus ovocitos (COC), clase A, obtenidos de folículos de 2-8mm de ovarios bovinos con menos de 5h de faenados, con aguja 18G, en buffer fosfato salino, con 5% de suero fetal bovino (SFb). Se maduraron en TCM-199 con 5% SFb y hormonas, en gotas de 100µl, 10-15 COC/gota, cubiertos con aceite mineral, en incubadora (38°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90-95% humedad), durante 22h. 8 grupos de COC fueron inseminados con semen de cuatro toros congelado en dos diluyentes: 1026-Andromed; 1026-Trilady; 3733-Andromed; 3733-Trilady; 5834-Andromed; 5834-Trilady; 9701-Andromed y 9701-Trilady. El semen se capacitó y seleccionó por gradientes de Percoll® en Talp-Sperm, centrifugando a 800G, 20m. Aspiramos el sobrenadante, al pellet le agregamos Talp-Sperm y centrifugamos durante 5m (500G), se ajustó a  $2 \times 10^6$  spz/ml con Talp-Fert. Formamos gotas, cubiertas con aceite mineral y las cocultivamos con los COC, 5h. Luego se lavaron y denudaron con vortex y se cultivaron en SOF. Realizamos el clivaje a las 48h y evaluamos el desarrollo embrionario (DE) al día 7, de acuerdo a las normas de la IETS. El promedio del clivaje fue de 62.17% y 39.11% el DE, acorde a lo esperado. Se realizó análisis de frecuencias por el Test Exacto de Fisher con significación de 5%. No encontramos diferencias significativas entre el semen de los distintos toros, en clivaje ( $p=0.32$ ), ni DE ( $p=0.58$ ). Tampoco entre los diluyentes, en clivaje ( $p=0.63$ ), ni DE ( $p=0.59$ ). Este trabajo es importante para conocer la calidad y fertilidad espermática del semen de raza BCU del banco.

Filipiak Y., Fila D.E., Aragunde R., Armstrong E.M., Boggio Devincenzi J.C., Larocca C.E., Martínez M.S., Álvarez V., Pereira J.M., Vila F., Llambi M.S. Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo, Uruguay. yael.filipiak@fvvet.edu.uy

## Introducción:

En la Facultad de Veterinaria existe un banco de semen de bovinos Criollo Uruguayo (BCU) (Proyecto I+D, 2016, más de 800 pajuelas) de la única reserva de BCU en Uruguay (~600 animales).

Es importante conocer la calidad del semen congelado del banco. El semen está congelado en 2 diluyentes: Andromed, sin yema de huevo; Triladyl, con yema de huevo.

Antes de utilizar semen con fines reproductivos es importante saber que sea apto, para ello se suele hacer el análisis del semen. Actualmente además se busca correlacionar la eficiencia de semen en la FIV con la fertilidad *in vivo*.

## Objetivos:

### General:

Evaluar la fertilidad *in vitro* de semen de cuatro toros congelado en dos diluyentes.

### Específicos:

- 1) Comparar fertilidad *in vitro* del semen congelado de distintos toros Criollos.
- 2) Comparar el efecto de dos diluyentes de semen en la fertilidad *in vitro* del semen congelado.

### Preguntas:

- ¿Cuál es la fertilidad *in vitro* del semen de diferentes toros criollos Uruguayos?
- ¿Cuál de los diluyentes del semen de los toros CU (Triladyl o Andromed) resulta mejor para su posterior uso en FIV?
- ¿El diluyente usado para la congelación del semen condiciona los resultados en la fertilidad *in vitro*?

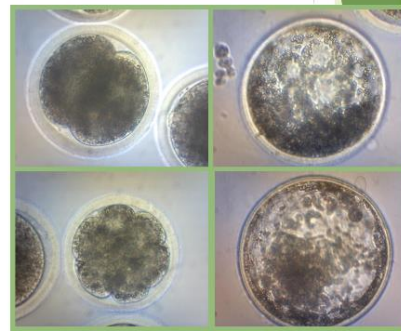
## Materiales y métodos:

122 complejos cúmulus ovocitos (COC), clase A, obtenidos de folículos de 2-8mm de ovarios bovinos con menos de 5h de faenados, con aguja 18G, en PBS, con 5% de suero fetal bovino (SFb). Se maduraron en TCM-199 con 5% SFb y hormonas, en gotas de 100µl, 10-15 COC/gota, cubiertos con aceite mineral, en incubadora (38°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90-95% humedad), durante 22h. 8 grupos de COC fueron inseminados con semen de cuatro toros congelado en dos diluyentes: 1026-Andromed; 1026-Triladyl; 3733-Andromed; 3733-Triladyl; 5834-Andromed; 5834-Triladyl; 9701-Andromed y 9701-Triladyl. El semen se capacitó y seleccionó por gradientes de Percoll® en Talp-Sperm, centrifugando a 800G, 20m. Aspiramos el sobrenadante, al pellet le agregamos Talp-Sperm y centrifugamos durante 5m (500G), se ajustó a 2x10<sup>6</sup> spz/ml con Talp-Fert. Formamos gotas, cubiertas con aceite mineral y las cocultivamos con los COC, 5h. Luego se lavaron y desnudaron con vortex y se cultivaron en SOF. Realizamos el clivaje a las 48h y evaluamos el desarrollo embrionario (DE) al día 7, de acuerdo a las normas de la IETS

## Resultados:

El promedio del clivaje fue de 62.17% y 39.11% el DE, acorde a lo esperado. Se realizó análisis de frecuencias por el Test Exacto de Fisher con significación de 5%. No encontramos diferencias significativas entre el semen de los distintos toros, en clivaje ( $p=0.32$ ), ni DE ( $p=0.58$ ). Tampoco entre los diluyentes, en clivaje ( $p=0.63$ ), ni DE ( $p=0.59$ ).

	COC	Clivaje	%	Desarrollo	%
1026	36	22	61,11	11	50,00
3733	25	13	52,00	4	30,77
5834	29	22	75,86	8	36,36
9701	32	19	59,38	7	36,84
A	68	43	63,24	18	41,86
T	54	33	61,11	12	36,36



Clivaje a las 48 h

desarrollo al día 7

## Conclusión:

Nos proporcionó un mejor conocimiento de la calidad y fertilidad espermática *in vitro* del semen de BCU del banco

Los resultados obtenidos son acordes a lo esperado y resultados históricos obtenidos en nuestro Laboratorio

Según los resultados, cualquiera de los sémenes estudiados (de los 4 toros) son fértiles y pueden ser considerados aptos

De igual modo, los dos diluyentes se comportaron de forma similar en la FIV

Estos resultados son resultados preliminares de un proyecto mayor, por lo que podremos arribar a conclusiones fehacientes al completar los ensayos

No encontramos antecedentes de FIV con semen de BCU, tampoco sobre el efecto de los distintos diluyentes en FIV en bovinos