



UBA
1821 Universidad
de Buenos Aires

.UBAveterinaria 
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Tesis de Maestría en Reproducción Animal

Relación entre la ecotextura del parénquima testicular y la producción y calidad seminal en toros de razas carniceras dadores de semen

Maestrando: Sergio A. Marcantonio, M.V., Esp.

Director: Giovanni Gnemmi, D.V.M., M. Sc., Ph. D.

Codirector: Marcelo H. Miragaya, M.V., M. Sc., Ph. D.

2020

Relación entre la ecotextura del parénquima testicular y la producción y calidad seminal en toros de razas carniceras dadores de semen

Resumen

La fertilidad es una de las variables clave en la producción bovina. Si bien ambos sexos intervienen en el resultado de preñez, la relación cuantitativa macho:hembra hace que la fertilidad de los toros cobre un papel fundamental. En el caso de los toros dadores de semen alojados en Centros de Colecta y Procesamiento de Semen (CCPS), la enorme capacidad de multiplicar el potencial reproductivo que brinda la inseminación artificial lleva a que la importancia de la fertilidad del macho sea aún mayor. El examen andrológico completo constituye una poderosa herramienta para estimar la fertilidad potencial de los toros. Desde hace veinte años se ha comenzado a considerar a la ultrasonografía (US) como una técnica no invasiva y atraumática para evaluar la estructura y funcionalidad del aparato reproductor del macho. El análisis computarizado de la imagen ultrasonográfica permite revelar diferencias en la ecotextura imperceptibles al ojo humano, posibilitando mediciones objetivas. El objetivo del trabajo fue evaluar el potencial de la US testicular para predecir la capacidad cuali/cuantitativa de producción de semen en los toros de CCPS. El trabajo fue llevado a cabo en las instalaciones del CRB, ubicado en cercanías de la localidad de San Antonio de Areco, provincia de Buenos Aires. Fueron incorporados al estudio 57 toros dadores en régimen de extracción, de entre 1,5 y 10 años de edad, de las razas carniceras Angus, Brangus, Braford, Limangus y Polled Hereford. La extracción de semen fue realizada por el método de la vagina artificial. Se registró la cantidad de eyaculados procesados y la producción de pajuelas durante las dos semanas anteriores y dos semanas posteriores a los tiempos “0” (día de la ultrasonografía), “30” (30 días después) y “60” (60 días después). Las imágenes ultrasonográficas fueron tomadas con un ecógrafo (modelo EXAGO®, ECM Angulemme, Francia) con un transductor lineal multifrecuencia, configurado en 7,5 MHz. Se tomaron 3 imágenes por testículo, en forma transversal en 3 posiciones: dorsal, media y ventral. Las imágenes fueron analizadas con el software ECOTEXT®. Se realizó un análisis de correlación entre todas las variables de Ecotext (EC1= cantidad de pixeles negros, EC2= cantidad de pixeles blancos, EC3=nivel medio de pixeles grises, %AH= % de áreas hipocogénicas, Diámetro= diámetro tubular y Densidad= densidad tubular) y la calidad y producción seminal (tiempo 0, tiempo 30 y tiempo 60). Luego se realizó un

análisis bivariante y multivariante (regresión logística multinomial) para predecir la congelabilidad de los eyaculados en función de la raza, la edad o la densidad de túbulos (densidad de áreas hipocogénicas) a la ecografía. La distribución de datos de ecotextura y microestructura testicular (media \pm D.E.) obtenidos en la población de toros dadores fue la siguiente: EC1:14,96 \pm 10,76; EC2: 50,24 \pm 105,58; EC3: 86,11 \pm 11,83; Área: 11,86 \pm 3,40; Diámetro: 126,08 \pm 23,73 μ m y Densidad: 137,54 \pm 17,67. No hubo diferencias significativas entre razas ni edades para los parámetros ultrasonográficos considerados ($p > 0,05$). Al analizar la relación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular con la calidad seminal al tiempo 0, pudo observarse una relación positiva entre la densidad de AH y el volumen seminal ($r = 0,32$). En cuanto a la morfología espermática, se pudo comprobar una relación negativa y altamente significativa entre EC2, EC3 y Diámetro tubular y el porcentaje de cabezas anormales ($r = -0,37$; $-0,52$; $-0,37$). El Diámetro se relacionó negativamente con el porcentaje de otras anomalías ($r = -0,30$). No se encontró correlación entre las variables de Ecotext y los parámetros de calidad seminal a los 30 días posteriores a la ecografía. A los 60 días posteriores al análisis ecográfico se observó una correlación positiva entre el Área y el Diámetro y la concentración espermática del eyaculado (0,33 y 035, respectivamente). No se encontraron correlaciones entre los parámetros de Ecotext y la movilidad posdescongelación al tiempo 0. Existieron diferencias significativas de Área y Diámetro entre toros productores de eyaculados de buena calidad a la descongelación y de eyaculados rechazados al tiempo 30 y 60 posecografía. No se observaron diferencias entre los parámetros de Ecotext de los toros que produjeron hasta 100 pajuelas por eyaculado, 101 a 150 pajuelas por eyaculado y más de 150 pajuelas por eyaculado. El valor de densidad de AH fue el único parámetro de Ecotext que permitió predecir el resultado de la congelación a tiempo 0. Todos los toros con valores ≤ 115 AH/cm² tuvieron semen no congelable. En conclusión, no obstante haberse demostrado distintos niveles de asociación entre los parámetros de Ecotext y la calidad seminal, es necesario continuar con los estudios a los efectos de comprobar la utilidad de esta herramienta en la predicción de la fertilidad potencial de los toros dadores de semen de CCPS.

Palabras clave: ecotextura; testículos; bovinos; semen; calidad.

Relationship between the echotexture of testicular parenchyma and seminal quality and sperm production in AI beef bulls

Summary

Fertility is a key variable in bovine production. Although both sexes take part in the pregnancy results, the quantitative relationship male:female means that the fertility of bulls plays a fundamental role. In the case of semen-donor bulls located in Semen Collection and Processing Centers (SCPC), the enormous capacity of artificial insemination for multiplying the reproductive potential makes the importance of male fertility even greater. A complete breeding soundness examination is a powerful tool for estimating the potential fertility of bulls. In the last twenty years, ultrasonography (US) has begun to be considered a non-invasive, non-traumatic tool for evaluating the structure and function of the male reproductive tract. Computerized analysis of the ultrasound image permits revelation of differences in echotexture that are imperceptible to the human eye and makes objective measurements possible. The objective of this study was to evaluate the potential of testicular US to predict the quali/quantitative capacity to produce semen in bulls belonging to SCPC. The work was carried out in the facilities of the CRB, a SCPC located close to the town of San Antonio de Areco, in the province of Buenos Aires. A total of 57 semen-donor bulls, on a regular semen collection regime, were included in the study. Bulls were between 1.5 and 10 years of age and comprised the following beef-producing breeds: Angus, Brangus, Braford, Limangus and Polled Hereford. Semen collection was carried out using an artificial vagina. The number of ejaculates processed and the production of frozen straws during the two weeks before and the two weeks after the time "0" (day of ultrasound), "30" (30 days post ultrasound) and "60" (60 days post ultrasound), were registered. Ultrasound images were taken using an EXAGO[®] ultrasound (ECM Angulemme, France) with a multifrequency linear transducer configured at 7.5 MHz. Three transversal images were taken per testicle, in 3 positions: dorsal, medium and ventral. The images were analyzed using the ECOTEXT[®] software. A correlation analysis was carried out between all the Ecotext variables (EC1= black pixels, EC2= white pixels, EC3= mean gray level of pixels, Density= density of hypoechogenic areas, Diameter= mean diameter of hypoechogenic areas and Area percentage of hypoechogenic areas in the total area of the region of interests) and semen quality and production (time 0, time 30 and time 60). Then a bivariant and multivariant

analysis (multinomial logistic regression) was carried out to predict the freezability of the ejaculates as related to breed, age or tubule density (density of hypoechogenic areas) measured by ultrasound. The distribution of the testicular echotexture and microstructure obtained in the semen-donor population of bulls were the following (mean \pm S.D.): EC1: 14.96 \pm 10.76; EC2: 50.24 \pm 105.58; EC3: 86.11 \pm 11.83; Area: 11.86 \pm 3.40; Diameter: 126.08 \pm 23.73 μ m and Density: 137.54 \pm 17.67. No significant differences ($p > 0.05$) were observed between breeds or between ages for any of the ultrasound parameters considered. When analyzing the relationship between seminal quality and the parameters of testicular echotexture and microstructure at time 0, a positive relationship was observed between the density of AH and seminal volume ($r = 0.32$). In regard to sperm morphology, a highly significant negative relationship was observed between the percentage of abnormal heads and EC2, EC3 and tubule diameter ($r = -0.37$; -0.52 ; -0.37 respectively). Diameter was also negatively correlated with the percentage of other sperm morphological abnormalities ($r = -0.30$). The quantity of black pixels (EC1) was positively correlated with the area, density and diameter of the seminiferous tubules ($r = 0.69$; 0.46 and 0.53 , respectively). No correlation was found between the Ecotext variables and seminal quality parameters at 30 days after the ultrasound measurements. A positive correlation was observed between area and diameter and sperm concentration in the ejaculate 60 days after the ultrasound measurements (0.33 and 0.35 , respectively). At day 0, no correlation was observed between the Ecotext parameters and post-thaw motility. Significant differences in area and diameter were observed between bulls that produced good quality post-thaw ejaculates and those that produced ejaculates that were rejected at 30 and 60 days post ultrasound. No differences were observed in the Ecotext parameters between bulls that produced 100 straws per ejaculate, 101 to 150 straws per ejaculate and more than 150 straws per ejaculate. The AH density was the only Ecotext parameter that permitted a prediction of the freezing results on day 0. All bulls with up to 115 AH/cm² produced semen that was not apt for freezing. In conclusion, despite having shown different levels of association between the Ecotext parameters and semen quality, it remains necessary to continue the studies to be able to confirm the use of this tool to predict potential fertility of semen-donor bulls from CCPS.

Key words: echotexture; testicles; bovine; semen; quality.

Agradecimientos

Al Dr. Giovanni Gnemmi, por sus enseñanzas, guía y gran motivación, y por sobre todas las cosas, por su confianza y amistad.

Al Dr. Marcelo Miragaya, por su estímulo para que iniciara mis estudios de posgrado.

A la Dra. Arantxa Echegaray, por su permanente apoyo y aporte crítico, en especial en el análisis estadístico e interpretación de los resultados.

A la firma española Humeco, que puso a disposición el equipamiento y software utilizados.

Al CRB, que generosamente me abrió sus puertas.

Al Dr. Hugo Quiroga, quien trabajó a la par, con gran predisposición.

A los Dres. Raúl Sara y Gisele Alza, que fueron clave para poder obtener información sobre calidad seminal.

Al Dr. Enrique F. Capdevielle por su enorme ayuda.

A Osvaldo González, Jorge Miranda, Marcelo Díaz y Jeremías Chamorro, por destinar generosamente su tiempo para que los toros estuvieran disponibles en las sucesivas evaluaciones.

A la Dra. Graciela Chaves por poner su enorme talento y tiempo en la corrección del trabajo y por estimularme a pensar.

A la Dra. Deborah Neild por su valiosa ayuda en la traducción al inglés.

A la Facultad de Cs. Veterinarias de la UBA, en particular a la Cátedra de Teriogenología, que es mi lugar de trabajo desde hace más de treinta años y me permitió formarme en reproducción bovina.

Y muy especialmente quiero agradecer a mi esposa Patricia y a mis hijos Nicolás y Joaquín por acompañarme en la vida.

Tabla de contenidos

Resumen.....	I
Agradecimientos.....	V
Tabla de contenidos.....	VI
Lista de tablas.....	VIII
Lista de figuras.....	IX
Lista de fotos.....	IX
Lista de abreviaturas.....	X
1. Introducción.....	1
1.1. Importancia de la fertilidad.....	2
1.2. Fertilidad y ultrasonografía.....	3
1.2.1. Principios de la ultrasonografía.....	3
1.2.2. Ultrasonografía del aparato genital del toro.....	6
1.2.2.1. Anatomía del tracto reproductivo del toro.....	6
1.2.2.1.1. Testículos.....	6
1.2.2.1.2. Epidídimos.....	7
1.2.2.1.3. Cordón espermático.....	7
1.2.2.1.4. Conducto deferente.....	8
1.2.2.1.5. Uretra.....	8
1.2.2.1.6. Pene.....	9
1.2.2.1.7. Prepucio.....	9
1.2.2.1.8. Glándulas vesiculares seminales.....	9
1.2.2.1.9. Próstata.....	9
1.2.2.1.10. Glándulas bulbouretrales.....	10
1.2.2.2. Microestructura testicular.....	10
1.2.2.3. Espermatogénesis.....	11
1.2.2.3.1. Espermatocitogénesis.....	12
1.2.2.3.2. Meiosis.....	12
1.2.2.3.3. Espermiogénesis.....	13
1.2.2.4. Evaluación ultrasonográfica de los testículos.....	13

1.2.2.4.1. <i>Análisis de la imagen</i>	14
1.2.3. <i>Fertilidad y Centros de Colecta y Procesamiento de Semen</i>	16
2. Hipótesis y objetivos.....	18
2.1. <i>Hipótesis</i>	19
2.2. <i>Objetivo general</i>	19
2.3. <i>Objetivos particulares</i>	19
3. Materiales y métodos.....	20
3.1 <i>Lugar de trabajo</i>	21
3.2. <i>Animales</i>	22
3.3. <i>Método de obtención de semen</i>	22
3.4 <i>Análisis de calidad seminal</i>	22
3.5. <i>Análisis de producción seminal</i>	23
3.6. <i>Método de obtención de imágenes ultrasonográficas</i>	23
3.7. <i>Análisis testicular mediante ultrasonografía</i>	24
3.8. <i>Análisis estadístico</i>	25
4. Resultados.....	27
4.1. <i>Variables de ecotextura y microestructura testicular</i>	28
4.2. <i>Variables de calidad seminal</i>	31
4.3. <i>Relación entre parámetros de Ecotext y calidad seminal</i>	33
4.4. <i>Relación entre parámetros Ecotext y movilidad posdescongelación</i>	39
4.5. <i>Correlación entre parámetros de Ecotext y cantidad de pajuelas producidas</i>	42
4.6. <i>Valor predictivo de los parámetros de Ecotext</i>	43
5. Discusión.....	44
6. Conclusiones.....	52
7. Perspectivas.....	54
8. Bibliografía.....	56
9. Anexo.....	64

Lista de tablas

Tabla 1. Distribución de datos de ecotextura y microestructura testicular (media \pm D.E.) obtenidos en la población de toros dadores.....	28
Tabla 2. Distribución de datos de ecotextura y microestructura testicular (media \pm D.E.) obtenidos en la población de toros dadores según raza.....	29
Tabla 3. Distribución de datos de ecotextura y microestructura testicular (media \pm D.E.) obtenidos en la población de toros dadores según edad.....	29
Tabla 4. Correlación entre datos de ecotextura y microestructura testicular obtenidos en la población de toros dadores.....	30
Tabla 5. Valores de calidad seminal (media \pm D.E.) de los eyaculas obtenidos en el momento del examen ultrasonográfico (T=0) clasificados por raza.....	31
Tabla 6. Características seminales en función de la edad de los toros dadores.....	32
Tabla 7. Valores de calidad seminal (media \pm D.E.) de los eyaculados obtenidos 30 días posteriores al examen ultrasonográfico (T=30) clasificados por raza.....	32
Tabla 8. Valores de calidad seminal (media \pm D.E.) de los eyaculados obtenidos 60 días posteriores al examen ultrasonográfico (T=60) clasificados por raza.....	33
Tabla 9. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y volumen, concentración y movilidad espermática al tiempo 0.....	34
Tabla 10. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y morfología espermática al tiempo 0.....	34
Tabla 11. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y volumen, concentración y movilidad espermática al tiempo 0 en toros con EC3 superior a 88.....	35
Tabla 12. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y morfología espermática al tiempo 0 en toros con EC3 superior a 88	35
Tabla 13. Calidad seminal en función de la Densidad ultrasonográfica.....	36
Tabla 14. Calidad seminal en función del nivel de gris (EC3).....	36
Tabla 15. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y volumen, concentración y movilidad espermática al tiempo 30.....	37
Tabla 16. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y morfología espermática al tiempo 30.....	37
Tabla 17. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y volumen, concentración y movilidad espermática al tiempo 60.....	38
Tabla 18. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y morfología espermática al tiempo 60.....	38
Tabla 19. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y movilidad individual posdescongelación a tiempo 0.....	39

Tabla 20. Correlación entre los parámetros de calidad seminal precongelación y movilidad individual posdescongelación.....	40
Tabla 21. Correlación entre los parámetros de Ecotext y el destino de la pajuela (aprobada o desaprobada).....	40
Tabla 22. Correlación entre los parámetros de Ecotext y el destino de la pajuela (aprobada o desaprobada) en toros con nivel de grises superiora 80.....	41
Tabla 23. Correlación entre los parámetros de Ecotext y el destino de la pajuela (aprobada o desaprobada) a tiempo 30.....	41
Tabla 24. Correlación entre los parámetros de Ecotext y el destino de la pajuela (aprobada o desaprobada) a tiempo 60.....	42
Tabla 25. Correlación entre los parámetros de Ecotext y la cantidad de pajuelas producidas por eyaculado.....	42
Tabla 26. Tabla de contingencia destino de pajuela y densidad a tiempo 0.....	43

Lista de figuras

Figura 1. Esquema del aparato reproductor del toro.....	6
Figura 2. Esquema del testículo bovino.....	7
Figura 3. Diagrama esquemático del escroto y cápsula testicular.....	11
Figura 4. Esquema del posicionamiento del transductor en forma transversal para cada testículo.....	23
Figura 5. Diseño experimental.....	26

Lista de fotos

Foto 1. Testículos de toro.....	8
Foto 2. Instalaciones del CRB: zona de colecta.....	21
Foto 3. Instalaciones del CRB: zona de alojamiento de toros dadores.....	21
Foto 4. Obtención de imágenes ultrasonográficas testiculares.....	24
Foto 5. Obtención de imágenes ultrasonográficas testiculares.....	24
Fotos 6. Imagen de la pantalla de ecógrafo evaluando uno de los toros.....	30
Fotos 7. Ultrasonogramas de diferentes toros incluidos en el estudio.....	31

Lista de abreviaturas

AH: área hipoecogénica

ANOVA: análisis de varianza

CCPS: centro de colecta y procesamiento de semen

Db: decibeles

EC1: ecotextura 1

EC2: ecotextura 2

EC3: ecotextura 3

GCD: gota citoplasmática distal

GCP: gota citoplasmática proximal

Hz: hertz

IA: inseminación artificial

MHz: megahertz

MI: movilidad individual

MM: movilidad de masa

US: ultrasonografía

1. Introducción

En el presente capítulo se realiza una revisión de la importancia de la fertilidad en la producción animal, los principios y usos de la ultrasonografía (US), la aplicación de la US en la evaluación del toro, anatomía del tracto reproductivo, principios de la espermatogénesis, evaluación US testicular y la importancia de la fertilidad en los toros de Centros de Colecta y Procesamiento de Semen (CCPS).

1.1. Importancia de la fertilidad

La fertilidad es una de las variables clave en la producción animal. En la ganadería bovina en particular, tanto en los rodeos de cría como en los rodeos lecheros, la eficiencia reproductiva condiciona su productividad y rentabilidad. Las fallas reproductivas generan cuantiosas pérdidas económicas en ambos sistemas (*Bellows y col. 2002; Gnemmi y Lefebvre, 2009; Gnemmi y Lefebvre, 2010; Inchaisri y col., 2010; Lucy, M.C., 2001*).

En los rodeos de cría, clásicamente se ha aceptado que los rasgos reproductivos (porcentaje de destete) tienen el doble de importancia económica relativa que los rasgos de producción (peso al destete) y diez veces la importancia de los atributos de carcasa (*Trenkle, A., 1977*). Veinte años más tarde, utilizando un modelo bioeconómico para comparar la importancia económica relativa de los rasgos para un productor comercial de terneros, se estableció que si bien no existe una relación consistente con la rentabilidad y que la misma es dependiente de cada planteo en particular, los rasgos de fertilidad son los de mayor impacto económico (*Boggs, D., 1997*).

Aunque ambos sexos intervienen en el resultado de preñez, la relación cuantitativa macho:hembra hace que la fertilidad de los toros cobre un papel fundamental. Tomando como ejemplo un rodeo de cría, por cada toro hay 20 a 40 hembras, lo que genera que la importancia de la fertilidad individual de los machos sea mayor que la de las hembras (*Rupp, G.P.L., 1977*).

En el caso de los toros dadores de semen alojados en Centros de Colecta y Procesamiento (CCPS), la enorme capacidad de multiplicar el potencial reproductivo que brinda la inseminación artificial hace que la importancia de la fertilidad del macho sea mucho mayor.

1.2. Fertilidad y ultrasonografía

El examen andrológico completo constituye una poderosa herramienta para estimar la fertilidad potencial de los toros, permitiendo descartar aquellos reproductores que no resulten aptos. Dicho examen incluye distintas etapas: a) evaluación clínica general, b) evaluación clínica particular del aparato genital, c) evaluación del estado sanitario, d) evaluación funcional del reproductor y e) evaluación de la calidad seminal (*Higdon y col., 2000; Hopkins, F.M., 1997*).

Hace aproximadamente veinte años, la ultrasonografía (US) comenzó a ser considerada una técnica no invasiva y atraumática para evaluar la estructura y funcionalidad del aparato reproductor del macho (*Chapwanya y col., 2008; Eilts y Pechman, 1988; Genedi y col., 2019; Ginther y col. 1998; Gnemmi y Lefebvre, 2009; Gnemmi y Lefebvre, 2010; Gnemmi y col., 2006; Hahn, J. y col., 1999; Kastelic y Brito, 2012; Magalhaes y col., 2019; Pasha y col., 2011; Pinho y col., 2012; Paschoal y col., 2019; Rault, P., 2006, Tomlinson y col., 2017; Urt y col., 2018, Genedy y col., 2019*). No obstante, esta técnica aún no se ha desarrollado en el toro de la misma manera que en la vaca (*Ginther, O.J., 1995; Pierson y Adams, 1995, Singh y col., 1997, Singh y col., 1998, Singh, J. and Adams, G.P., 2000*).

1.2.1. Principios de la ultrasonografía

La tecnología del ultrasonido nació en 1881 con el desarrollo de los efectos piezoeléctricos por parte de Pierre y Jacques Curie estudiando la compresión del cuarzo. Luego fue aplicada en forma de SONAR (*Sound Navigation and Ranging*) durante la segunda guerra mundial para la detección de barcos, submarinos y aviones de guerra (*Ginther, O.J., 1989; Perkins, T., 2000*). A partir de 1950, la ultrasonografía o ecografía se convirtió en una herramienta para producir imágenes de los tejidos y órganos internos con fines diagnósticos (*WHO, 2011*).

La US comenzó a emplearse en medicina veterinaria en la década del 70 en el diagnóstico de preñez en cerdas (*Eilts, B.E., 1988*). Su aplicación en bovinos y equinos a partir de la década del 80 ha sido uno de los pasos más importantes para el estudio y comprensión de los eventos reproductivos (*Pierson, R.A. y Ginther, O.J., 1988*).

La US utiliza ondas ultrasonoras de alta frecuencia para producir imágenes en distintos cortes de tejidos y órganos, tanto externos como internos. La emisión de ondas

de ultrasonido se obtiene por medio de la vibración de pequeños cristales de cuarzo ubicados en el transductor del equipo que se expanden y contraen en respuesta a pulsos de corriente eléctrica (*propiedad piezoeléctrica*). Estos movimientos producen ondas ultrasonoras que cuando alcanzan los tejidos son reflejadas (ecos) y captadas por los mismos cristales y convertidas nuevamente en señales eléctricas y transformados en un punto en la pantalla del aparato, en una escala de grises (*Ginther, O.J., 1995*).

Se trata de ondas de sonido de alta frecuencia (más de 20.000 ciclos por segundo), inaudibles para el ser humano (*Rantanen y Ewing, 1981*). La frecuencia del sonido se mide en hertz (Hz). Un Hz equivale a 1 ciclo por segundo y 1 megahertz (MHz) a 1 millón de ciclos por segundo. Los ultrasonidos producidos por los equipos de ultrasonografía o escáneres vibran a una frecuencia comprendida entre 1 y 10 MHz (*Goddard, P.J., 2000*), en tanto que los sonidos audibles para los humanos vibran a frecuencias muy inferiores (20-20.000 Hz) (*Ginther, O.J., 1995*).

Las ondas de ultrasonidos viajan a través de los tejidos que tienen densidades acústicas diferentes. Al propagarse a través de los tejidos, las ondas van perdiendo intensidad (atenuación) por la resistencia que ejercen (impedancia acústica). Cuando las ondas alcanzan el límite entre dos tejidos adyacentes con distinta densidad genera una interface. Una porción variable de ella regresa al transductor como una reflexión o eco. Las interfaces posibilitan delimitar los órganos en estudio y las distintas densidades permiten evaluar los cambios normales o anormales de dichos órganos (*Ghoshal y col., 2013*).

Al propagarse por el tejido escaneado, el haz de ultrasonido puede tomar distintas trayectorias: 1) reflexión (eco), 2) dispersión, 3) refracción en distintas direcciones y 4) absorción, la energía de la onda es absorbida por el tejido, convirtiéndose en calor (*Ginther, O.J., 1995*).

Cuando el área atravesada por el haz es líquida no refleja la onda y se dice que la imagen es anecogénica o anecoica. Los distintos tejidos se observan blancos o en escala de grises, en función de su ecogenicidad (capacidad de reflejar la onda de sonido).

Cuando los ecos vuelven al transductor, es posible reconstruir un mapa bidimensional de todos los tejidos que se han interpuesto en los haces. La información se almacena en una computadora y se expone en una pantalla. Los ecos potentes,

denominados “de alta intensidad”, aparecen en la pantalla como puntos más brillantes (*WHO, 2011*). El retraso entre la emisión de la onda y la recepción es utilizado para estimar la distancia entre el cristal y la superficie reflectora (*Ginther, O.J., 1995*).

En la actualidad, la mayoría de los equipos de US utilizados para el diagnóstico en bovinos son modo B (bidimensional) y en tiempo real. El modo-B se refiere a la modalidad brillo de los puntos o píxeles en la pantalla, con la formación de una imagen bidimensional. El brillo del punto es proporcional a la amplitud de los ecos y es representado en una escala de grises que va desde el blanco (hiperecogénico) al negro (anecogénico o anecoico). El término imagen en tiempo real se refiere a los movimientos en la imagen ya que los ecos son registrados continuamente y cada evento puede ser visto en el momento que ocurre (*Ginther, O.J., 1995*)

El tipo de transductor habitualmente empleado para examinar el tracto reproductivo se denomina lineal, debido a que los cristales piezoeléctricos están dispuestos uno al lado del otro (alineados) a lo largo del transductor. Las ondas generadas por cada cristal se transmiten en forma paralela. La estimulación secuencial de los cristales produce una imagen en forma de rectángulo, donde el ancho se corresponde con el largo de la fila de cristales y las imágenes de los tejidos cercanos al transductor se verán en la parte superior de la pantalla.

El poder de resolución del equipo se refiere a la capacidad que posee una onda de ultrasonido de distinguir dos tejidos con ecogenicidad muy similar (*Ginther, O.J., 1986*). Cuanto mayor es la frecuencia del transductor, mayor es la resolución, pero menor el poder de penetración (distancia focal).

El conjunto de ondas que genera un tejido contribuyen a formar el patrón de escala de grises del mismo o “ecotextura” (*Ginther, O.J., 1995*). El brillo o intensidad depende de la ecogenicidad del tejido o capacidad del mismo de reflejar ondas ultrasonoras. La ecogenicidad del tejido está determinada por la magnitud de la diferencia en la impedancia acústica del mismo, o resistencia a la propagación de las ondas (*Ginther, O.J., 1995*), relacionado con la densidad o compresibilidad en las múltiples interfaces del tejido, así como con el tamaño, forma, concentración y distribución de las dispersiones individuales (*Hunt y col., 1995; Powis, R.I., Powis, W.J., 1984; Silverman, R.H., 1990; Vlad y col., 2005*). Las estructuras hiper o hipoecogénicas aparecen blancas u oscuras,

respectivamente, mientras que las anecogénicas o anecoicas aparecen negras ya que no reflejan ondas.

1.2.2. Ultrasonografía del aparato genital del toro

Como se trata de un método de diagnóstico no invasivo, es posible repetir el examen ultrasonográfico del tracto reproductivo sin alterar el potencial del animal, obteniendo una imagen de la arquitectura interna de los distintos órganos y tejidos, complementando el examen andrológico del toro (*Ahmad, N.N., 1991*). Por lo tanto, la US puede constituir una herramienta adecuada para la evaluación anatómica y funcional del aparato reproductor del toro realizada en condiciones de campo (*Eilts y Pechman, 1988*).

1.2.2.1. Anatomía del tracto reproductivo del toro

El tracto reproductivo del toro está constituido por los testículos (gónadas masculinas), una porción tubular (epidídimos, conductos deferentes, uretra/pene) y las glándulas accesorias (glándulas bulbouretrales, glándulas vesiculares y próstata) (Figura 1).

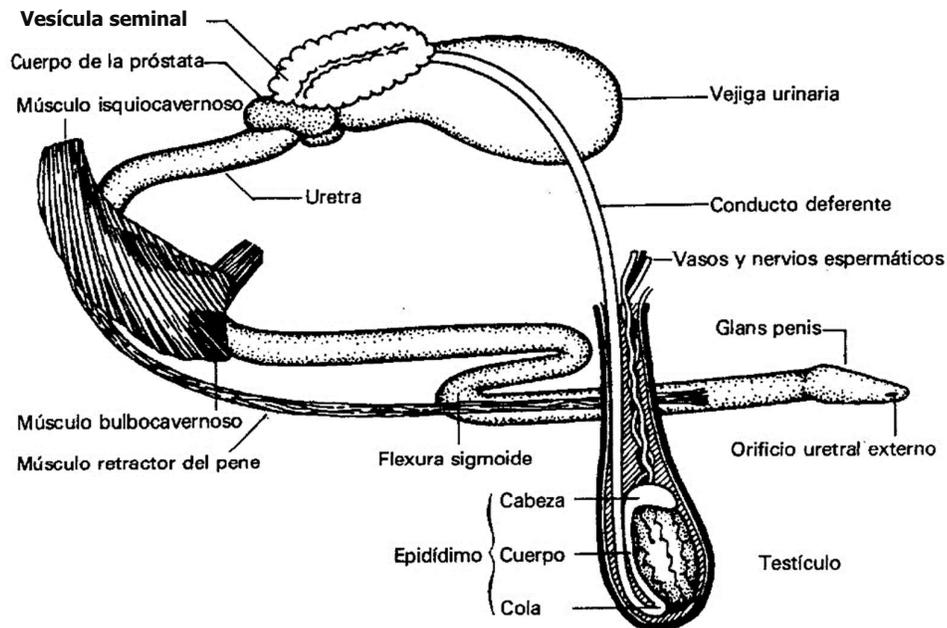


Figura 1. Esquema del aparato reproductivo del toro. Tomado de Galotta, J.M., 2009.

1.2.2.1.1. Testículos

Los testículos son órganos *gameto-hormonales*. Es decir, tienen dos funciones: 1) producir los espermatozoides y 2) sintetizar y secretar hormonas esteroideas.

Son órganos pares, localizados en una cavidad denominada escroto, que es una evaginación de la pared abdominal, compuesta por piel (epidermis y dermis), túnica Dartos, subdartos, túnica vaginal lámina parietal, cavidad vaginal, túnica vaginal lámina visceral y túnica albugínea. El escroto está dividido por un rafe medio formando dos compartimientos y cada uno contiene un testículo.

Están ubicados en la región inguinal, en posición vertical. El testículo tiene forma ovoide alargada, con un eje vertical largo (10 a 12 cm) y un eje cráneo-caudal corto (6 a 8 cm) (*DesCôteaux, L.G., 2010; Sisson, S., 1973*). El tamaño del testículo depende de la edad, de la raza y del desarrollo corporal. En un toro adulto pesa alrededor de 250-300 g (*Hafez, L., 1989; Salisbury, G.W., 1978*).

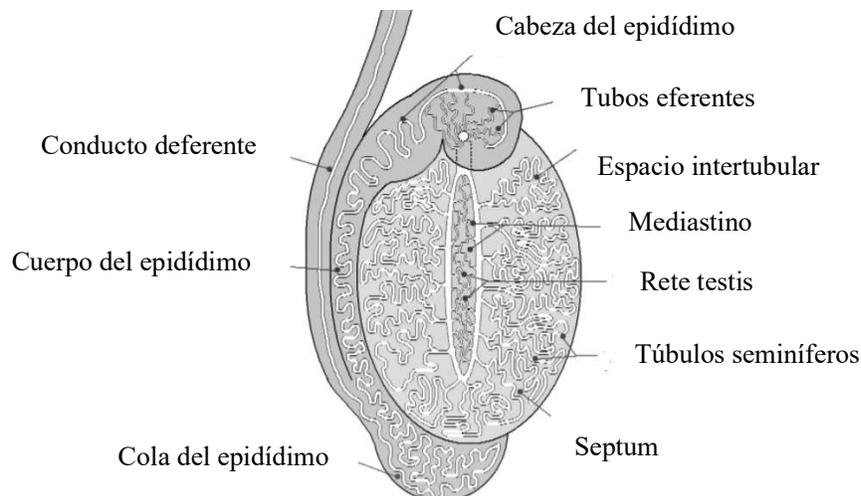
1.2.2.1.2. Epidídimos

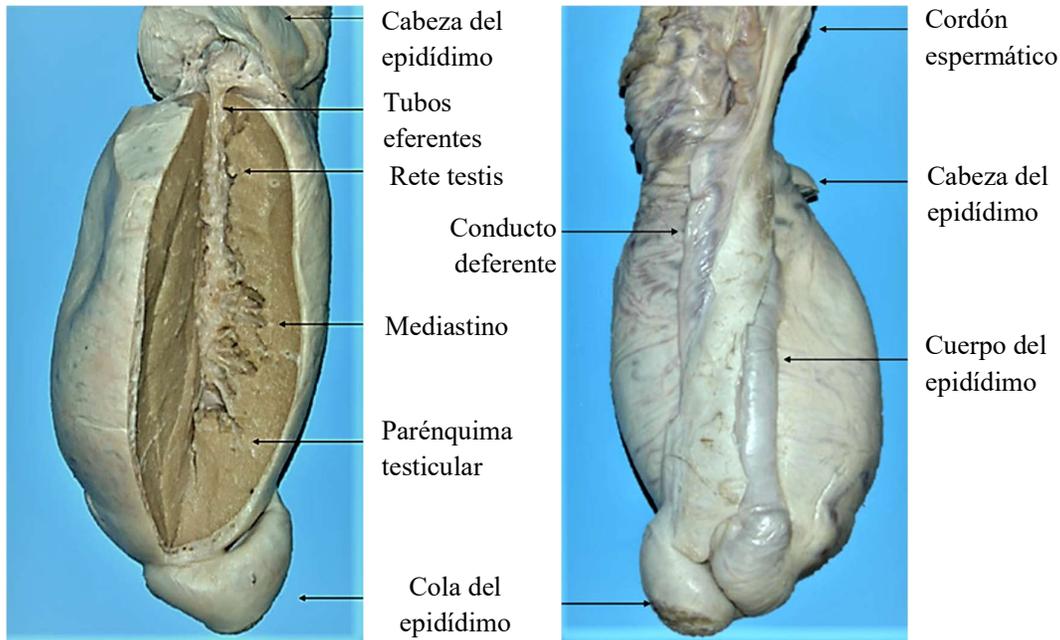
Son órganos pares, ubicados en estrecha relación anatómica con cada testículo. El epidídimo tiene tres partes: cabeza, cuerpo y cola (Figura 2). La cabeza del epidídimo es aplanada y está próxima al polo dorsal del testículo. El cuerpo es delgado y alargado y se extiende desde la cara póstero-medial del testículo hasta la cola. La cola del epidídimo es el segmento más notable y se localiza ventralmente.

1.2.2.1.3. Cordón espermático

El cordón espermático se identifica dentro del cuello escrotal y aparece dorsalmente al testículo. El testículo está suspendido en el escroto por el músculo cremáster. Otras estructuras importantes son el conducto deferente y las arterias y venas enroscadas (el plexo pampiniforme) que proporcionan un mecanismo de termorregulación con un intercambio de calor a contracorriente.

Figura 2. Esquema del testículo bovino. Adaptado de Aponte y col., 2005.





Fotos 1. Testículos de toro. Gentileza Dr. M. Drost.

1.2.2.1.4. *Conductos deferentes*

Este túbulo emerge de la cola del epidídimo como un túbulo recto y pasa, como parte del cordón espermático, a través del anillo inguinal hacia la cavidad del cuerpo.

El conducto deferente finaliza en una porción ensanchada denominada “ampolla del conducto deferente”, de 12 cm de largo y 1,5 cm de ancho. Las ampollas son las glándulas accesorias más craneales y tienen una forma tubular con paredes gruesas.

1.2.2.1.5. *Uretra*

Los dos conductos deferentes se unen en un solo conducto (la uretra pelviana), que finalmente se integra al pene (uretra peneana).

La uretra sirve como vía de paso común para los productos producidos por el macho: el semen del tracto reproductivo y la orina del tracto urinario.

La uretra pélvica, descansa en el piso de la pelvis, se extiende desde la arcada isquiática hasta el cuello de la vejiga. Un poderoso músculo rodea asimétricamente la uretra y le da una forma cilíndrica. La porción ventral del músculo es más gruesa que la dorsal. Tiene unos 3 cm de diámetro y 20 cm de largo. La uretra peneana es la porción extrapelviana de la uretra. Se halla ubicada en el surco uretral rodeada por una capa de tejido eréctil, el cuerpo esponjoso del pene.

1.2.2.1.6. *Pene*

El pene es el órgano copulador del macho. Tiene aproximadamente 120 cm de longitud y 3 a 4 cm de diámetro. Es un órgano fibroelástico y, por lo tanto, rígido incluso cuando no está erecto. Para su estudio se lo divide en las siguientes partes: raíz, cuerpo y glande. La raíz del pene está representada por la reunión de dos formaciones fibrosas, llamadas pilares del pene. Entre los pilares se halla el bulbo del pene (antes llamado bulbo de la uretra). Cada pilar está oculto por un músculo isquiocavernoso (*Galotta, J.M., 2009*). El cuerpo del pene está formado por los dos cuerpos cavernosos, separados por el tabique del pene. El cuerpo del pene describe en reposo una S llamada flexura sigmoidea. Durante la erección desaparece, siendo restituida por acción del músculo retractor del pene. La uretra peneana se halla ubicada en el surco uretral rodeada por una capa de tejido eréctil, el cuerpo esponjoso del pene, antiguamente cuerpo cavernoso de la uretra. El glande es una almohadilla que protege el extremo craneal del cuerpo cavernoso, por fuera de la albugínea; su tejido esponjoso se continúa con el cuerpo esponjoso del pene. La anatomía del glande es muy característica. El glande del pene está provisto de nervios y es la fuente de las sensaciones asociadas con la cópula.

1.2.2.1.7. *Prepucio*

Por delante del escroto, la piel aumenta su grosor y se invagina ventral y lateralmente formando un pliegue: el prepucio, que encierra una cavidad, la cavidad prepucial, donde está alojada la porción libre del pene (*Galotta, J., 2009*).

1.2.2.1.8. *Glándulas vesiculares seminales*

Las glándulas vesiculares o vesículas seminales son pares. Son de forma irregular y lobulada, de unos 10 a 12 cm de largo y 1,5 a 6 cm de ancho (*DesCôteaux, L.G., 2010*). El tamaño de estas glándulas aumenta más que las otras glándulas accesorias en relación con la edad. Se encuentran en dorsal de la vejiga y desembocan cada una por un conducto excretor en el colículo seminal (*Galotta, J., 2009*).

1.2.2.1.9. *Próstata*

La próstata está ubicada en el cuello de la vejiga urinaria donde desemboca la uretra. Se divide en dos partes: el cuerpo y la porción diseminada. El cuerpo de la próstata está dividido en dos lóbulos. Ubicado en dorsal al cuello de la vejiga, mide alrededor de

3,5 cm por 1,5 cm. La porción diseminada mide unos 12 cm de largo y no es identificable por la palpación transrectal. Está posicionada entre la *pars dorsal* del músculo uretral y el tejido cavernoso.

1.2.2.1.10. Glándulas bulbouretrales

Las glándulas bulbouretrales o de Cowper son ovoides a fusiformes, con un diámetro de aproximadamente 2 cm, ubicadas a ambos lados de la uretra pélvica, muy cerca del arco isquiático. No son detectables por palpación rectal por estar cubiertas por el músculo bulbo-esponjoso. A diferencia de otras especies como el equino y los camélidos, en el toro no son fácilmente identificables tampoco por ecografía. Una de las funciones de su secreción es limpiar la uretra de cualquier residuo de orina que pueda ser perjudicial para los espermatozoides.

1.2.2.2. Microestructura testicular

El parénquima testicular contiene cientos de túbulos largos y enrollados, denominados túbulos seminíferos, dentro de los cuales se forman los espermatozoides (espermatogénesis). Los túbulos seminíferos forman en el mediastino una red, la red testicular. Los conductos eferentes procedentes de la red, en número de doce, salen por la extremidad superior del mediastino (*Sisson, S., 1973*).

Cerca del 90% del parénquima testicular de los toros adultos está compuesto por túbulos seminíferos (*Dyce y col., 1990*). Entre los túbulos se localizan células intersticiales o de Leydig, que son las principales productoras de andrógenos, además de vasos sanguíneos y linfáticos.

En un corte transversal del túbulo seminífero pueden observarse desde la pared hacia la luz del túbulo, una membrana basal rodeada de células mioideas, que actúa como barrera hemato-testicular, las células de sostén o células de Sertoli y las células germinales en sus distintos estadios contenidas entre los citoplasmas de las anteriores, ubicándose las espermátidas o espermatozoides con sus colas hacia la luz del túbulo (*Hafez, L., 2000*).

Cada lóbulo testicular contiene dos o tres túbulos seminíferos contorneados que se anastomosan hacia el centro y se tornan rectos; se comunican luego con la *rete testis*, continúan después como conductos eferentes y salen del testículo para continuar en el epidídimo.

Los túbulos seminíferos son tortuosos y de sección redonda. Su diámetro varía de 63 a 351 μm y el área de 3.094 a 97.096 μm^2 (Tripathi y col., 2015). El aumento en la espermatogénesis lleva a un incremento en el diámetro y espesor de los túbulos seminíferos. Un trabajo realizado en bovinos de raza Fleckvieh describe un diámetro de 80 a 120 μm en animales de 18 a 27 semanas de edad y de 120 a 180 μm en animales de 30 a 45 semanas de vida (Wrobel, K.H., 2000).

En la mayoría de las especies, los túbulos seminíferos ocupan entre el 60 y 90% del volumen testicular (Setchell, B.P., 1982) y el 10 al 40% restante corresponde al tejido intertubular (células de Leydig y estroma) (França, L.R., 1998).

En toros, los túbulos seminíferos representan entre el 72 al 85% del volumen testicular (Amann, R.P., 1962; Goiozo y col., 2005; Santos y col., 1999).

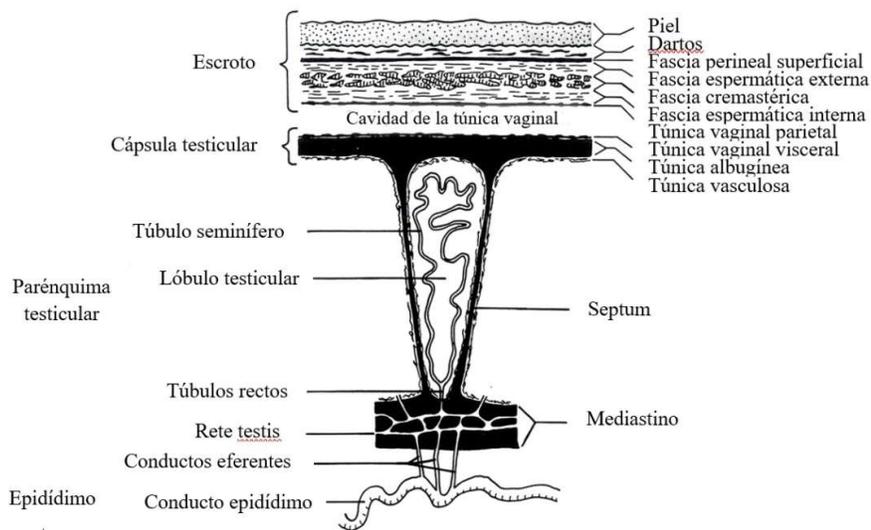


Figura 3. Diagrama esquemático del escroto y cápsula testicular. Adaptado de Davis, J.R., 1970.

1.2.2.3. Espermatogénesis

Es un complejo y ordenado proceso de multiplicación y diferenciación de células germinales que conduce a la producción de espermatozoides en los túbulos seminíferos. Implica una diferenciación celular mediante la cual las espermatogonias (*stem cells*) pasan a través de una serie de divisiones mitóticas, meióticas y transformaciones citológicas hasta generar espermatozoides (Barth, A. y Oko, R.J., 1989). Este proceso

ocurre a nivel de los túbulos seminíferos y tiene una duración en el bovino de 61 días (Staub, C., 2018).

Durante la espermatogénesis, la espermatogonia se diferencia en espermatocitos y espermatidas luego del proceso de mitosis y meiosis respectivamente (Barth, A. y Oko, R.J., 1989).

La espermatogénesis es dividida en tres fases: 1) espermatocitogénesis (mitosis), 2) meiosis y 3) espermiogénesis (diferenciación sin división).

1.2.2.3.1. Espermatocitogénesis

Este proceso implica división mitótica celular. Durante el mismo, las células germinales participan en un ciclo de varias divisiones mitóticas que aumenta el rendimiento de la espermatogénesis y permite renovar las células madre y producir espermatogonias y espermatocitos primarios (Staub, C., 2018).

La espermatogonia es una célula germinal ubicada junto a la membrana basal del túbulo seminífero. Hay distintos tipos de espermatogonias en el bovino: A, I y B.

Hay cuatro tipos de espermatogonias A en el toro: A0, A1, A2 y A3. La espermatogonia de reserva (A0) se divide formando una nueva A0 y una A1.

La espermatogonia A1 origina espermatogonias A2, la cual se divide generando una espermatogonia latente (A1) y una activa (A3) que comenzará una nueva generación de células germinales en desarrollo (Bearden, H.J., 1997).

La espermatogonia A3 experimenta cuatro divisiones mitóticas formando 16 espermatocitos primarios.

1.2.2.3.2. Meiosis

Cada espermatocito primario tiene una primera división meiótica generando 2 espermatocitos secundarios. La meiosis implica la duplicación e intercambio de material genético y dos divisiones celulares que reducen el número de cromosomas y producen cuatro espermátides redondas haploides. Esta etapa lleva aproximadamente 15 días (Bearden, H.J., 1997).

Cada espermatocito secundario se divide por meiosis formando 2 espermátidas. Por lo tanto, se forman 4 espermátidas de cada espermatocito primario, o 64 a partir de cada espermatogonia activa (A3).

1.2.2.3.3. *Espermiogénesis*

La espermiogénesis implica la diferenciación de las espermátidas redondas en espermatozoides completamente maduros liberados en la luz de los túbulos seminíferos. Durante esta etapa, cada espermátida se transforma en espermatozoide por metamorfosis (Bearden, H.J., 1997). El material nuclear se compacta formando la cabeza del espermatozoide y el resto de la célula se elonga formando la cola (Rodríguez-Martínez, H., 2006). También se forma el acrosoma alrededor de la cabeza del espermatozoide (Bearden, H.J., 1997). El espermatozoide es la única célula que no tiene citoplasma, que lo pierde durante la formación de la cola, generando la gota citoplasmática. La mitocondria se dispone en espiral en la parte superior de la cola, formando la vaina mitocondrial (Harder y col. , 1995). Los espermatozoides recién formados se liberan de la célula de Sertoli y se expulsan a través de la luz de los túbulos seminíferos hacia la *rete testis* (Bearden, H.J., 1997).

El tránsito espermático a través de los conductos eferentes y epidídimo está asociado con cambios madurativos como adquisición de movilidad progresiva, condensación del núcleo, modificación en la forma del acrosoma y de la membrana plasmática y migración de la gota citoplasmática de proximal a distal de la pieza media (Rodríguez-Martínez, H., 2006).

1.2.2.4. **Evaluación ultrasonográfica de los testículos**

La US escrotal fue reportada por primera vez en el hombre en 1974 (Miskin, M., 1974), luego en toros (Eilts, B.F., 1988) y en otros animales. Por ser una técnica no invasiva, costo-efectiva y repetible ha sido incorporada a numerosos protocolos para la evaluación de patologías escrotales e infertilidad. Actualmente, combinada con el análisis computarizado de imágenes, se ha convertido en una herramienta potencial para evaluar la fertilidad.

Para realizar la evaluación ultrasonográfica, el toro debe ser sujetado en la casilla de operaciones, inmovilizado con el cepo. Los testículos son fácilmente accesibles al examen ultrasonográfico. Se utilizan habitualmente transductores lineales de 5-10 MHz.

La US modo-B permite una rápida visualización de las estructuras macroscópicas internas. Las principales características observables a nivel testicular son: 1) la *rete testis*, vista como una línea hiperecogénica o una región circular central, según se coloque el transductor en forma longitudinal o transversal, respectivamente; 2) el parénquima testicular, típicamente descrito como de ecotextura homogénea y 3) la túnica albugínea y escroto, visto como una línea hiperecogénica que rodea el parénquima testicular con una capa anecoica debido a la presencia de líquido entre las capas parietal y visceral de la túnica vaginal. La cabeza y cola del epidídimo, cordón espermático y septum escrotal pueden ser vistos dependiendo de la ubicación del transductor en los planos longitudinal y transversal.

1.2.2.4.1. *Análisis de la imagen*

La observación visual no permite realizar un análisis preciso de la ecotextura testicular, dado la limitada capacidad del ojo humano de distinguir niveles o matices de grises. Visualmente, es posible distinguir 18 a 20 tonos de gris, lo que origina diferentes percepciones y consecuentemente variaciones en la interpretación de la imagen (*Pierson y Adams, 1995*).

Un análisis computarizado de la imagen permite revelar diferencias en la ecotextura imperceptibles al ojo humano, posibilitando mediciones objetivas y el establecimiento de algoritmos computarizados. Estos algoritmos han sido desarrollados específicamente para reducir la subjetividad visual y cuantificar los valores de cada pixel de la imagen (*Singh y col., 2003*).

El histograma de pixeles de la imagen del parénquima testicular se ha estudiado ampliamente en toros, carneros, caballos, perros, con resultados diferentes en cuanto a su relación con la calidad seminal.

La imagen ultrasonográfica está compuesta por miles de puntos o pixeles. Cada pixel representa una reflexión discreta en el tejido (*Singh y col., 2003*). El software de análisis de imágenes permite asignar a cada pixel un valor preciso, con un rango que va de 0, representando al negro, al 255, representando al blanco. El nivel medio de grises es por lo tanto, la media de los niveles de gris de todos los pixeles en el área estudiada. La desviación estándar de los valores de pixeles define la heterogeneidad.

El parénquima testicular es homogéneo y moderadamente ecogénico (*Pechman, R.D. y Eilts, B.E., 1986*). Las características de ecotextura del parénquima testicular se

obtienen evaluando múltiples áreas circulares, conocido como la técnica de medición puntual (*Pierson y Adams, 1995; Singh y col., 2003*). Existe una correlación entre la ecogenicidad y las características histomorfológicas testiculares. En general, se observa un aumento de la ecogenicidad desde el nacimiento hasta la pubertad en varias especies, incluidas el humano (*Hamm, B. y Fobbe, F.F., 1995*), el bovino (*Aravindakshan y col., 2000; Brito y col., 2012; Chandolia, R.K., 1997b; Evans, A.C.O., 1996; Gnemmi y col., 2018*) y el ovino (*Chandolia y col., 1997; Kumar y col., 2018*).

Aravindakshan y col. (2000) indicaron un aumento gradual de la ecogenicidad testicular hasta aproximadamente las 16 semanas, que fue asociado con proliferación celular. Seguidamente se observa una disminución en la intensidad de los píxeles atribuida por los autores a un aumento en el volumen de los túbulos seminíferos y una mayor proporción de líquido en el tejido, que comienza alrededor de este período y refleja la transformación de un testículo prepúber a púber. El valor de la intensidad de píxeles aumenta nuevamente desde aproximadamente 32 semanas en adelante y, según estos investigadores, está relacionado con la formación gradual de tipos de células más maduras, coincidiendo con el inicio de la espermatogénesis.

Los autores relacionaron estos cambios en la ecogenicidad con la diferenciación de las células de Sertoli, la formación de la barrera hemato-testicular, el aumento del diámetro de los túbulos seminíferos y del tamaño de su luz, aumento de la proporción del parénquima testicular ocupado por los túbulos y una expansión de la población de células germinales al inicio de la espermatogénesis (*De Souza, C.C., 2016*). Luego de la pubertad, la ecogenicidad de los testículos del toro no cambia significativamente (*Brito y col., 2012*).

Barth y col. (2008), utilizaron la US para el estudio del aparato reproductivo del toro, evaluando la asociación entre fibrosis testicular y baja calidad seminal, concluyendo que durante el proceso activo de fibrosis diagnosticado por US hubo alteración en la espermatogénesis. No obstante, otros autores no encontraron correlación entre la ecotextura testicular y la calidad seminal (*Arteaga y col., 2005; Brito, L.F.C., 2002; Pinho y col., 2012*).

Adicionalmente, la ecogenicidad se ha correlacionado con parámetros seminales, especialmente en las semanas siguientes a la evaluación ultrasonográfica (*Ahmadi y col., 2012; Arteaga y col., 2005; Brito y col., 2012*). Estos resultados indican que el análisis

de la ecotextura permite detectar cambios endócrinos y en la microestructura testicular. Sin embargo son necesarios mayores estudios.

1.2.3. Fertilidad y Centros de Colecta y Procesamiento de Semen

La evaluación de la calidad seminal como herramienta para definir la aptitud reproductiva del toro utilizado en servicio natural, por lo general no es empleada en los rodeos de cría de la Argentina, como sí en otros países (*Hopkins, F.M. y Spitzer, J.C., 1997; Kastelic y Thundathil, 2008*). En tanto sí es un proceso realizado de rutina en los CCPS. Este examen incluye la evaluación de parámetros como volumen, concentración espermática, movilidad y morfología espermáticas, que pueden complementarse con técnicas más sofisticadas que permiten evaluar integridad y funcionalidad de membranas, integridad acrosomal, maduración de la cromatina, etc. (*Amann y Waberski, 2014; Barth, A., 2001; Ericsson, S.A. y col., 1993; Moce y Grahamb, 2008; Rodríguez-Martínez, H., 2007*).

Si bien los resultados de un programa de inseminación artificial (IA) dependen de una gran cantidad de factores, la calidad de las dosis de semen utilizadas es importante (*Sellem y col., 2015; Vincent y col., 2014*). Incluso existen diferencias en la fertilidad de las dosis de semen en eyaculados de un mismo toro (*Brito y col., 2002; Sabés-Alsina y col., 2017*).

La IA es una biotecnología de la reproducción cuya adopción ha sido creciente en los rodeos bovinos desde su introducción en Argentina (*Marcantonio, S., 1990*). En la actualidad se encuentran habilitados 38 CCPS bovinos y 17 bancos de semen bovino en Argentina (*SENASA, 2019*). El número de dosis de semen bovino congelado comercializadas en 2018 fue 6.274.275 (2.791.103 pajuelas de toros de razas lecheras y 3.843.172 pajuelas de toros de razas carniceras). Del total de dosis comercializadas en el año, 5.291.982 fueron utilizadas en el mercado interno y 982.293 exportadas (*CABIA, 2018*).

La incorporación de un toro en el CCPS se realiza principalmente en función de su valor genético, teniendo en cuenta su ascendencia (pedigrí), sus características de performance individual y su descendencia (progenie). La fertilidad es una condición *sine qua non* para aprovechar su potencial genético y debe ser exhaustivamente evaluada.

Además de la fertilidad, la evaluación del potencial de producción de dosis de semen de los toros dadores en los CCPS, es un aspecto muy importante porque condiciona el futuro del macho dador y la rentabilidad del sistema (*Decuadro-Hansen, G., 2000*).

Como regla general, ingresan a los CCPS toros jóvenes que exhiben una buena circunferencia escrotal (CE), alta concentración espermática, buena movilidad y pocas anomalías espermáticas. La concentración se correlaciona positivamente con la movilidad individual (+0,4 a +0,9) y el porcentaje de anomalías totales está negativamente relacionado con la concentración y la movilidad (*Dumont, P., 1998*). También se ha observado en toros jóvenes altas correlaciones entre la CE y los parámetros cuantitativos del eyaculado (concentración y número total de espermatozoides) (*Coulter y col., 1987; Thibier y col., 1972*).

Algunos países realizan una evaluación de la función reproductiva de los toros, durante la última fase de selección individual antes de ingresar a un CCPS, para evitar que ingresen animales con baja productividad. Esta prueba consiste en la evaluación de cinco colectas dobles (10 eyaculados, siendo eliminados los dos primeros). Los parámetros espermáticos evaluados son: el volumen, la concentración, la movilidad en masa, presencia de leucocitos, la movilidad individual, el porcentaje de anomalías y la movilidad pos descongelación (*Decuadro-Hansen, G., 2000*).

El uso de la US para evaluar la ecotextura de parénquima testicular en los toros dadores de semen podría ser una importante herramienta para predecir la capacidad cuali/cuantitativa de producción de semen en los toros de CCPS, aportando eficiencia al sistema.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

- La ecotextura del parénquima testicular tiene un valor predictivo sobre la calidad y cantidad de semen producido por el toro.
- La densidad y diámetro de los túbulos seminíferos estimada por ultrasonografía está correlacionada con la producción espermática del toro.

2.2. Objetivo general

- Evaluar el potencial y viabilidad del uso de la ultrasonografía testicular como herramienta de predicción de fertilidad en toros de CCPS.

2.3. Objetivos particulares

- Evaluar posibles diferencias en la ecotextura del parénquima testicular en función de la raza y edad.
- Evaluar la correlación entre la densidad y diámetro de los túbulos seminíferos y la calidad seminal.
- Evaluar la correlación entre la densidad y diámetro de los túbulos seminíferos estimada mediante ultrasonografía y el potencial de producción del toro.

3. Materiales y métodos

3.1. Lugar de trabajo

El trabajo fue llevado a cabo en las instalaciones del CRB, centro de colecta y procesamiento de semen bovino (CCPS) ubicado en cercanías de la localidad de San Antonio de Areco, provincia de Buenos Aires (Ruta Nacional 41, Km 270, coordenadas geográficas 34°19'23.9"S 59°29'18.2"W), distante 120 km de la Ciudad de Buenos Aires (CABA).

Las evaluaciones de morfología espermática fueron realizadas en el laboratorio de espermatozoología de la Cátedra de Teriogenología, INITRA, FCV-UBA.

3.2. Animales

Fueron incorporados al estudio 57 toros dadores en régimen de extracción, de entre 1,5 y 10 años de edad, de las razas carniceras Angus (n=30), Brangus (n=12), Braford (n=10), Limangus (n=3) y Polled Hereford (n=2).



Fotos 2 y 3. Instalaciones del CRB. Arriba: zona de colecta. Abajo: zona de alojamiento de toros dadores.

No todos los toros aportaron datos para cada una de las evaluaciones, por lo que hay diferencias en los “n” utilizados.

3.3. Método de obtención de semen

La extracción de semen fue realizada por el método de la vagina artificial, siguiendo la rutina del CCPS. Los toros dadores estaban en régimen de colecta “2 x 2”, es decir, obtención de 2 eyaculados por día, 2 veces por semana.

3.4. Análisis de calidad seminal

Se realizó el control de calidad seminal de rutina utilizado en el CCPS, incluyendo las siguientes determinaciones en el eyaculado: volumen, concentración, movilidad de masa microscópica, movilidad individual progresiva y morfología espermática.

El volumen fue medido utilizando la escala graduada del tubo colector; la concentración espermática mediante espectrofotometría (Fotómetro SDM 1, Minitube®); la movilidad de masa microscópica fue evaluada a través de una gota gruesa con microscopio óptico a 100 x con platina termostatzada; la movilidad individual progresiva mediante una muestra diluida entre porta y cubreobjetos a 400 x con platina termostatzada y la morfología espermática con una muestra diluida con solución salina formolada entre porta y cubreobjetos en contraste de fase a 1000 x contando al menos 100 células por muestra.

Todas las determinaciones se hicieron siguiendo el siguiente criterio de evaluación, que divide a los eyaculados en aptos y no aptos en función de la concentración, movilidad de masa macroscópica, movilidad individual, vigor y porcentaje de espermatozoides normales. Los eyaculados con una concentración ≥ 500.000 espermatozoides/mm³; movilidad de masa microscópica ≥ 4 (escala de 0 a 5); movilidad individual progresiva $\geq 70\%$; vigor ≥ 4 (escala de 0 a 5) y porcentaje de espermatozoides normales $\geq 70\%$ fueron considerados aptos (criterio utilizado por el CRB).

La evaluación de la calidad seminal posdescongelación consistió en el análisis de la movilidad individual progresiva y vigor, realizada entre porta y cubreobjetos a 400 x con platina termostatzada.

El criterio de clasificación de las pajuelas en aptas y no aptas consideró la movilidad individual progresiva posdescongelación y el vigor. Las pajuelas aptas tuvieron una movilidad individual progresiva posdescongelación $\geq 40\%$ y un vigor ≥ 4 (criterio utilizado por el CRB).

La evaluación de la calidad seminal se realizó en el tiempo “0”: momento en el que se realizó la evaluación ultrasonográfica testicular; en el tiempo “30”: 1 mes después de la determinación ecográfica y en el tiempo “60”: 2 meses después de la evaluación ultrasonográfica testicular.

3.5. Análisis de producción seminal

Se registró la cantidad de eyaculados procesados y la producción de pajuelas durante las dos semanas anteriores y dos semanas posteriores a los tiempos “0”, “30” y “60”. Se registró la cantidad de eyaculados obtenidos por toro y la cantidad de pajuelas por eyaculado.

3.6. Método de obtención de imágenes ultrasonográficas

Los toros fueron sujetos en la casilla de operaciones del CCPS, inmovilizados con cepo y con el refuerzo de bozal y soga. Se utilizó una tranca posterior para evitar la patada del animal (*tranca garronera*). La cola fue atada mediante una soga a los efectos de evitar los movimientos defensivos de la misma y facilitar la obtención de las imágenes. Ningún toro fue sometido a sedación.

Las imágenes ultrasonográficas fueron tomadas con un ecógrafo (modelo EXAGO®, ECM Angulemme, Francia) con un transductor lineal multifrecuencia (5 a 10 MHz), configurado en 7,5 MHz.

Se tomaron 3 imágenes por testículo, con el transductor colocado en forma transversal en 3 posiciones: dorsal, media y ventral (6 imágenes por toro). Para ello se procedió a descender hacia la base del escroto el testículo a evaluar, fijándolo en esa posición con la mano izquierda y maniobrando el transductor con la mano derecha. A los efectos de lograr el mejor contacto posible entre el transductor y la piel escrotal se utilizó abundante gel ecográfico.

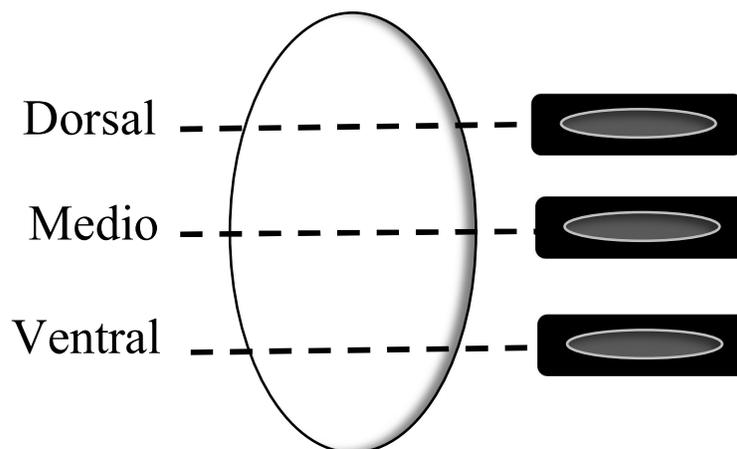


Figura 4. Esquema del posicionamiento del transductor en forma transversal para cada testículo.



Fotos 4 y 5. Obtención de imágenes ultrasonográficas testiculares.

La configuración del equipo (*set up*) fue la siguiente: Profundidad: 6 cm; Ganancia: 0; Frecuencia dinámica: 65 db; Potencia: 100%; FR: 47 y Foco: 4 cm.

3.7. Análisis testicular mediante ultrasonografía

Las imágenes ultrasonográficas fueron analizadas objetivamente con el software ECOTEXT® (análisis computarizado de imágenes). El programa utiliza varios algoritmos desarrollados para el análisis de los ultrasonogramas testiculares en base a la distribución de píxeles negros, blancos y grises y también en función del tamaño y densidad de áreas hipoeogénicas dentro de un área de parénquima de 2,64 cm². Mide un total de seis parámetros; tres a resolución normal (Ecotext1, Ecotext 2 y Ecotext 3) y tres de alta resolución (*Echegaray y col.2018 a*).

Ecotext 1 (EC1) hace referencia al número de píxeles negros (un valor 0 o cercano a 0); Ecotext 2 (EC2) se corresponde con el número de píxeles que tienen un valor de 256 o próximo a 256 y Ecotext 3 (EC3) al número de píxeles intermedios o grises.

El software aplica varios filtros a la imagen del parénquima testicular y sobre la imagen modificada, evalúa la densidad (áreas hipoeogénicas/cm²), área total (% de áreas hipoeogénicas) y diámetro medio (μm) de áreas hipoeogénicas.

Las imágenes de alta resolución aportan datos relacionados con los túbulos seminíferos: a) densidad de túbulos/cm²; b) porcentaje de área que ocupa la luz de los

túbulos en el parénquima y c) diámetro medio de las luces de los túbulos seminíferos en micras.

Las imágenes ultrasonográficas fueron tomadas en ambos testículos a tres niveles (transversal dorsal, transversal mediano y transversal ventral), con lo cual se obtuvieron 6 imágenes por toro.

3.8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico sobre los valores de los seis parámetros ecográficos de Ecotext para determinar si existían diferencias entre testículos (izquierdo o derecho) o posición de escaneado (dorsal, media o ventral). Se realizó un ANOVA o un análisis de *Kruskal-Wallis* para confirmar o no una distribución normal (Prueba de *Kolmogorov-Smirnoff*), respectivamente. En caso de no haber diferencias entre testículos o posición de escaneado, se pueden agrupar los datos. Si la distribución de las variables de ecotextura es normal se utilizó la media; en caso de ausencia de normalidad, se tomó la mediana como parámetro de tendencia central.

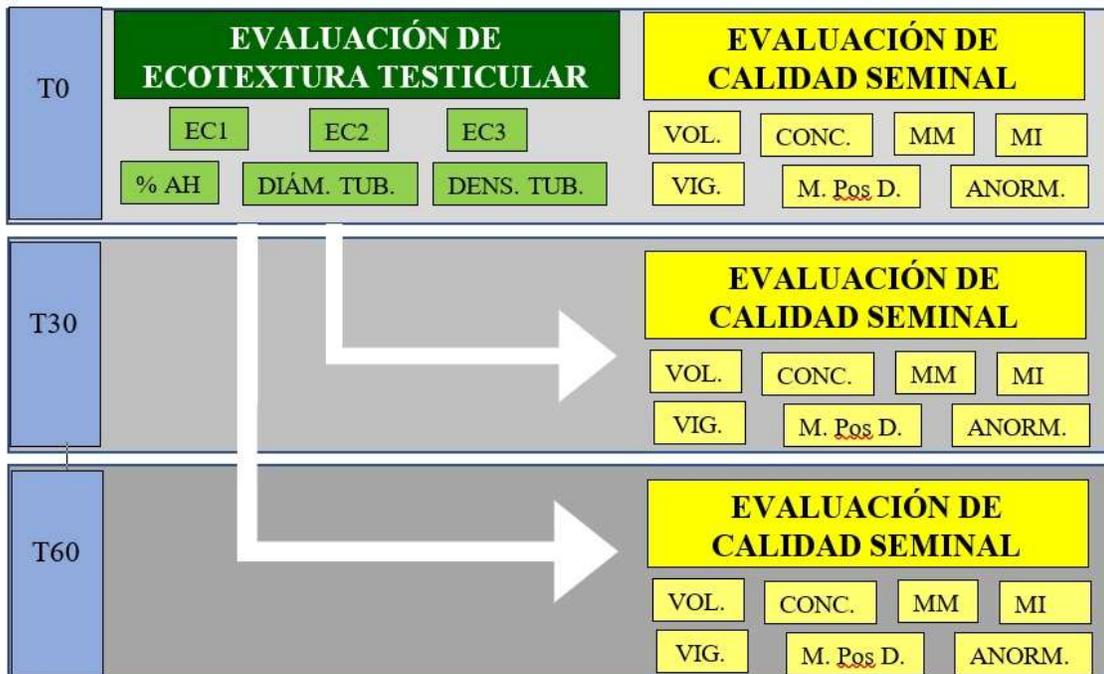
Se efectuó un análisis estadístico descriptivo para caracterizar las distintas variables incluidas en el estudio (raza, edad, circunferencia escrotal, parámetros de Ecotext y calidad seminal).

Se realizó un análisis de correlación entre todas las variables de Ecotext y la calidad seminal (correlación de *Pearson* para distribución normal o de *Spearman* para distribución no normal) y producción seminal (tiempo 0, tiempo 30 y tiempo 60).

Luego se realizó un análisis bivalente (ANOVA para variables normales o *Kruskal-Wallis* para variables no normales) y multivalente (regresión logística multinomial) para predecir la congelabilidad de los eyaculados en función de la raza, la edad o la densidad de túbulos (densidad de áreas hipoecogénicas) a la ecografía.

Fue considerado significativo un valor $p < 0,05$. El análisis fue realizado con el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Figura 5. Diseño experimental.



T0= tiempo 0; T30=tiempo 30; T60= tiempo 60; AH= área hipocogénica; Diám. Tub.= diámetro tubular; Dens. Tub.= densidad tubular; Vol.= volumen; Conc.= concentración; MM= movilidad masal; MI= movilidad individual; Vig.= vigor; M.pos D.= movilidad y vigor posdescongelación; Anorm.= anomalías espermatocitarias

4. Resultados

4.3. Variables de ecotextura y microestructura testicular

Se procedió a excluir los datos atípicos (*outliers*) procedentes de imágenes con artefactos (EC1 > 45; EC3 < 60; Área > 20; Diámetro > 200 μm y densidad < 60).

Luego de comprobar que no existían diferencias significativas en los valores de las 6 variables de Ecotext entre testículo izquierdo y derecho y en las diferentes posiciones de escaneado (dorsal, media y ventral) ($p > 0,05$) se procedió a agrupar los datos, calculando la media de la mediana de los mismos.

Los valores de Ecotext pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de datos de ecotextura y microestructura testicular (media \pm D.E.) obtenidos en la población de toros dadores.

	Parámetro	n	Media \pm D.E.
Ecotextura	EC1	52	14,96 \pm 10,76
	EC2	54	50,24 \pm 105,58
	EC3	54	86,11 \pm 11,83
Microestructura	Área (%)	53	11,86 \pm 3,40
	Diámetro (μm)	54	126,08 \pm 23,73
	Densidad (áreas hipocogénicas/cm ²)	54	137,54 \pm 17,67

Los valores de ecotextura y microestructura testicular en función de la raza pueden observarse en la Tabla 2. No hubo diferencias significativas entre razas para los parámetros ultrasonográficos considerados ($p > 0,05$).

Para analizar los valores de los parámetros de ecotextura y microestructura testicular en función de la edad de los toros, se procedió a clasificar a los reproductores en tres categorías: ≤ 2 años; > 2 y < 5 años y ≤ 5 años (Tabla 3). No se encontraron diferencias significativas entre las distintas edades para los parámetros de ecotextura y microestructura testicular ($p > 0,05$).

Tabla 2. Distribución de datos de ecotextura y microestructura testicular (media \pm D.E.) obtenidos en la población de toros dadores según raza.

Raza		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (μm)	Densidad (AH/cm ²)
Angus	n	27	27	27	27	27	27
	Media \pm D.E.	16,87 \pm 10,03	50,26 \pm 122,00	86,17 \pm 10,82	11,72 \pm 2,68	123,27 \pm 18,90	141,19 \pm 18,00
Braford	n	10	10	10	10	10	10
	Media \pm D.E.	14,50 \pm 10,61	63,750 \pm 132,37	87,99 \pm 15,31	11,92 \pm 4,94	126,99 \pm 32,63	134,00 \pm 17,18
Brangus	n	10	12	12	11	12	12
	Media \pm D.E.	14,30 \pm 13,87	42,46 \pm 55,52	83,81 \pm 12,75	12,61 \pm 4,04	135,14 \pm 27,63	132,37 \pm 18,39
Hereford	n	2	2	2	2	2	2
	Media \pm D.E.	12,50 \pm 0,71	46,25 \pm 14,49	91,57 \pm 7,03	11,12 \pm 2,37	113,40 \pm 13,01	151,47 \pm 7,67
Limangus	n	3	3	3	3	3	3
	Media \pm D.E.	3,17 \pm 1,75	38,83 \pm 67,26	84,88 \pm 11,33	10,60 \pm 2,77	120,50 \pm 19,76	127,93 \pm 10,67
Total	n	52	54	54	53	54	54
	Media \pm D.E.	14,96 \pm 10,76	50,24 \pm 1,58	86,11 \pm 11,83	11,86 \pm 3,40	126,08 \pm 23,73	137,54 \pm 17,67

AH= áreas hipocogénicas.

Tabla 3. Distribución de datos de ecotextura y microestructura testicular (media \pm D.E.) obtenidos en la población de toros dadores según edad.

Edad		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (μm)	Densidad (AH/cm ²)
Hasta 2 años	n	15	16	16	16	16	16
	Media \pm D.E.	18,27 \pm 9,92	68,40 \pm 155,98	84,26 \pm 13,95	12,68 \pm 3,90	130,93 \pm 28,67	135,50 \pm 21,86
Más de 2 y menos de 5 años	n	18	19	19	18	19	19
	Media \pm D.E.	11,25 \pm 9,52	36,71 \pm 43,47	86,31 \pm 10,43	11,24 \pm 2,87	126,09 \pm 22,59	137,41 \pm 15,73
5 o más años	n	19	19	19	19	19	19
	Media \pm D.E.	15,87 \pm 11,91	48,47 \pm 100,85	87,48 \pm 11,66	11,76 \pm 3,46	121,98 \pm 20,58	139,39 \pm 16,33
Total	n	52	54	54	53	54	54
	Media \pm D.E.	14,96 \pm 10,76	50,24 \pm 105,58	86,11 \pm 11,83	11,86 \pm 3,40	126,08 \pm 23,73	137,54 \pm 17,67

Los parámetros de Ecotext se relacionan entre sí de la siguiente manera: EC1 se correlaciona en forma negativa con EC2 y EC3 y en forma positiva con el % AH y el diámetro tubular, en tanto EC2 y EC3 se correlacionan negativamente con el % AH y el

diámetro y positivamente con la densidad tubular. Los valores de las correlaciones pueden observarse en la Tabla 4.

Tabla 4. Correlación entre datos de ecotextura y microestructura testicular obtenidos en la población de toros dadores.

		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm ²)
EC1	n	52	52	52	52	52	52
	r	1	-0,35*	-0,48**	0,65**	0,56**	-0,01
EC2	n	54	53	54	54	52	54
	r	-0,35*	1	0,89**	-0,68**	-0,74**	0,53**
EC3	n	52	54	54	53	54	54
	r	-0,48**	0,89**	1	-0,84**	-0,87**	0,54**
Área	n	52	54	53	53	53	53
	r	0,65**	-0,68**	-0,84**	1	0,93**	-0,33*
Diámetro	n	52	52	54	53	54	54
	r	0,56**	-0,74**	-0,87**	0,93**	1	-0,57**
Densidad	n	52	54	54	53	54	54
	r	-0,01	0,53**	0,54**	-0,33*	-0,57**	1

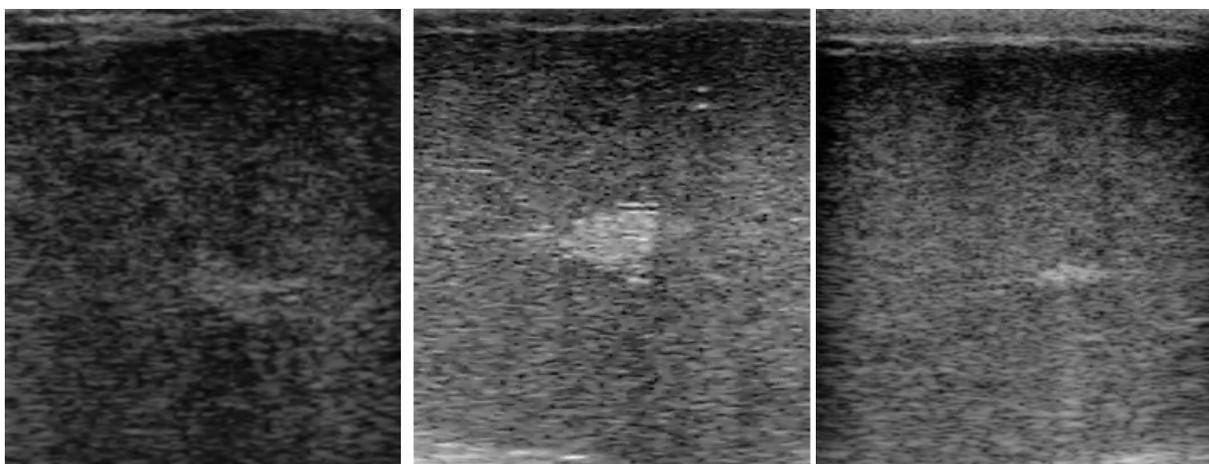
** diferencias significativas $p < 0,01$.

* diferencias significativas $p < 0,05$.

En los toros con un nivel medio de gris (EC3) > 88 se observó una correlación negativa de EC3 con el % AH, diámetro y densidad ($r = -0,86$, $-0,85$ y $-0,61$, respectivamente) y una correlación positiva entre EC1 y % AH, diámetro y densidad ($r = 0,63$, $0,54$ y $0,47$).



Foto 6. Imagen de la pantalla de ecógrafo evaluando uno de los toros.



Fotos 7. Ultrasonogramas de diferentes toros incluidos en el estudio.

4.2. Variables de calidad seminal

El régimen de extracción de semen de los toros durante el ensayo fue $4,07 \pm 1,39$ eyaculados por semana. Los datos de las variables de calidad seminal al momento del análisis ecográfico (T=0) pueden verse en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de calidad seminal (media \pm D.E.) de los eyaculados obtenidos en el momento del examen ultrasonográfico (T=0) clasificados por raza.

Raza	n	Volumen (ml)	Conc. (mill/mm ³)	MM (0-5)	MI (%)	Vigor (0-5)	MI poscong. (%)	Vigor poscong. (0-5)
Angus	30	5,80 \pm 2,09	0,91 \pm 0,32	4,30 \pm 0,70	86,83 \pm 7,60	4,57 \pm 0,63	44,17 \pm 15,98	4,03 \pm 1,16
Brangus	12	4,58 \pm 1,43	0,95 \pm 0,46	3,83 \pm 1,11	71,50 \pm 28,07	4,00 \pm 0,85	42,73 \pm 18,81	4,00 \pm 1,00
Braford	10	4,95 \pm 1,77	0,91 \pm 0,42	3,80 \pm 0,63	77,00 \pm 15,49	4,10 \pm 0,74	43,75 \pm 21,21	3,88 \pm 0,83
Hereford	2	10,25 \pm 1,06	0,85 \pm 0,35	4,00 \pm 0,00	90,00 \pm 00,00	4,50 \pm 0,71	55,00 \pm 7,07	5,00 \pm 0,00
Limangus	2	4,00 \pm 0,00	1,25 \pm 0,35	5,00 \pm 0,00	87,50 \pm 3,54	5,00 \pm 0,00	40,00 \pm 28,28	3,50 \pm 2,12
Total	56	5,48\pm2,10	0,93\pm0,37	4,13\pm0,81	81,93\pm16,50	4,38\pm0,73	44,06\pm17,72	4,02\pm1,08

Conc.= concentración; MM= movilidad de masa; MI= movilidad individual; poscong.= poscongelación

Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el volumen y porcentaje de espermatozoides normales entre los toros de hasta 2 años y los mayores (Tabla 6).

Tabla 6. Características seminales en función de la edad de los toros dadores.

Edad		Vol (ml)	Conc (esp/mm ³)	MM (0-5)	MI (%)	Norm	Cabeza	Cola	GCP	GCD	Otras	AcrNorm
Hasta 2 años	n	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	Media ±D.E.	4,39 ±1,27 ^a	952,78 ±346,18	3,89 ±1,13	79,72 ±18,98	57,39 ±26,97 ^a	5,50 ±7,56	10,72 ±12,08	9,55 ±11,06	1,94 ±4,50	5,55 ±8,10	74,50 ±28,52
Más de 2 y hasta 5 años	n	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Media ±D.E.	5,77 ±2,27 ^b	925,00 ±438,45	4,20 ±0,62	86,25 ±6,66	65,65 ±30,26 ^b	4,45 ±7,65	6,95 ±5,70	8,80 ±15,88	0,95 ±1,99	5,25 ±8,63	74,65 ±27,03
Más de 5 años	n	18	19	18	18	19	19	19	19	19	18	19
	Media ±D.E.	6,22 ±2,24 ^b	910,53 ±427,06	4,28 ±0,57	83,89 ±11,05	80,63 ±6,54 ^b	4,63 ±7,29	7,58 ±5,40	3,74 ±3,07	1,21 ±2,61	2,33 ±3,48	74,42 ±13,12
Total	n	56	57	56	56	57	57	57	57	57	56	57
	Media ±D.E.	5,47 ±2,11	928,95 ±400,66	4,13 ±0,810	83,39 ±13,11	68,03 ±25,25	4,84 ±7,38	8,35 ±8,21	7,35 ±11,51	1,35 ±3,14	4,41 ±7,20	74,53 ±23,46

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$).

Vol= volumen; Conc.= concentración; MM= movilidad de masa; MI= movilidad individual; Norm= espermatozoides normales; Cabeza= anomalías de cabeza; Cola= anomalías de cola; GCP= gota citoplasmática proximal; GCD= gota citoplasmática distal; Otras= otras anomalías; AcrNorm= acrosomas normales.

Los datos de calidad seminal 30 días posteriores a la evaluación ecográfica pueden verse en la Tabla 7. Dieciséis toros fueron retirados del CCPS antes de los 30 días posecografía.

Tabla 7. Valores de calidad seminal (media ± D.E.) de los eyaculados obtenidos 30 días posteriores al examen ultrasonográfico (T=30) clasificados por raza.

Raza	n	Volumen (ml)	Concent. (mill/mm ³)	MM (0-5)	MI (%)	Vigor (0-5)	MI poscong. (%)	Vigor poscong. (0-5)
Angus	19	5,58±1,17	0,99±0,42	4,42±0,61	86,05±5,37	4,53±0,61	51,05± 6,58	4,63± 0,50
Brangus	9	4,83±1,60	0,86±0,41	4,11±1,27	81,11±23,15	4,44±1,33	56,25± 5,18	4,88± 0,35
Braford	10	5,35±1,73	0,94±0,41	4,00±0,82	84,50±5,99	4,50±0,71	51,00± 7,38	4,60± 0,52
Hereford	2	9,75±1,06	0,80±0,14	4,00±0,00	90,00±0,00	5,00±0,00	55,00 ±7,07	5,00± 0,00
Total	40	5,56±1,71	0,94±0,40	4,23±0,83	84,75±12,19	4,53±81,61	52,31±6,67	4,69±0,47

Concent= concentración; MM= movilidad de masa; MI= movilidad individual; poscong.= poscongelación

Los datos de calidad seminal 60 días posteriores a la evaluación ecográfica pueden verse en la Tabla 8. Veintidós toros fueron retirados del CCPS antes de los 60 días posecografía.

Tabla 8. Valores de calidad seminal (media \pm D.E.) de los eyaculados obtenidos 60 días posteriores al examen ultrasonográfico (T=60) clasificados por raza.

Raza	n	Volumen (ml)	Concent. (mill/mm ³)	MM (0-5)	MI (%)	Vigor (0-5)	MI poscong. (%)	Vigor poscong. (0-5)
Angus	16	5,13 \pm 1,72	1,07 \pm 0,40	4,25 \pm 0,68	86,56 \pm 5,39	4,56 \pm 0,73	52,50 \pm 6,58	4,81 \pm 0,40
Brangus	8	5,00 \pm 2,55	1,11 \pm 0,35	4,13 \pm 0,99	76,88 \pm 22,98	4,13 \pm 0,99	54,29 \pm 7,87	4,86 \pm 0,38
Braford	10	5,20 \pm 1,49	0,95 \pm 0,42	4,10 \pm 0,32	84,50 \pm 4,38	4,30 \pm 0,67	54,00 \pm 6,99	4,80 \pm 0,42
Total	34	5,12\pm 1,83	1,04\pm 0,39	4,18\pm0,67	83,68\pm12,08	4,38\pm0,78	53,33\pm6,81	4,82\pm0,39

Concen= concentración; MM= movilidad de masa; MI= movilidad individual; poscong.= poscongelación

Las variables de calidad seminal tomadas al momento del examen ecográfico (T=0), a los 30 (T=30) y a los 60 días posteriores (T=60) no siguieron una distribución normal, con excepción del volumen.

4.5. Relación entre parámetros de Ecotext y calidad seminal

Debido a que un grupo importante de ecografías tuvo valores de EC3 inferiores a 80 (más oscuras o subexpuestas), los análisis de correlación y bivalente fueron realizados en forma global, para los toros con EC3 >80 y para los toros con EC3 >88.

Al analizar la relación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular en forma global con la calidad seminal al tiempo 0, pudo observarse una relación positiva entre la edad y el volumen seminal ($r=0,40$) y entre la densidad de AH y el volumen seminal ($r=0,32$) (Tabla 9).

En cuanto a la morfología espermática, se observó una relación positiva entre la edad de los toros dadores y el porcentaje de espermatozoides normales ($r=0,35$). Asimismo, se pudo comprobar una relación negativa y altamente significativa entre EC2, EC3 y densidad con el porcentaje de cabezas anormales ($r= -0,37$, $-0,52$ y $-0,37$, respectivamente). El diámetro se relacionó negativamente con el porcentaje de otras anomalías ($r=-0,30$). (Tabla 10).

Tabla 9. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y volumen, concentración y movilidad espermática al tiempo 0.

		Edad	EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm ²)
Volumen (ml)	n	56	51	53	53	52	53	53
	r.	0,40**	0,07	0,01	0,05	0,00	-0,09	0,32*
Concentración (esp./mm³)	n	57	52	54	54	53	54	54
	r	0,00	-0,18	-0,09	-0,02	-0,01	-0,03	-0,08
MM (0-5)	n	56	51	53	53	52	53	53
	r	0,15	-0,04	-0,13	-0,08	-0,01	-0,02	-0,11
MI (%)	n	56	51	53	53	52	53	53
	r	0,07	-0,07	0,15	0,21	-0,18	-0,23	0,21

** p< 0,01; * p< 0,05.

Tabla 10. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y morfología espermática al tiempo 0.

Morfología		Edad	EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm ²)
Normal	n	57	52	54	54	53	54	54
	r	0,35**	-0,06	0,02	0,02	-0,06	-0,11	0,22
Anorm. de cabeza	n	57	52	54	54	53	54	54
	r	-0,09	0,26	-0,37**	-0,52**	0,46**	0,50**	-0,37**
Anorm. de cola	n	57	52	54	54	53	54	54
	r	-0,02	-0,01	0,06	0,06	0,12	0,10	-0,18
GCP	n	57	52	54	54	53	54	54
	r	-0,14	0,03	0,18	0,08	0,11	0,09	-0,02
GCD	n	57	52	54	54	53	54	54
	r	0,01	0,09	0,15	0,02	0,16	0,07	-0,03
Otras anorm.	n	56	51	53	53	52	53	53
	r	-0,04	-0,15	0,29*	0,37**	-0,23	-0,30*	0,38**
Acrosomas normales	n	57	52	54	54	53	54	54
	r	-0,16	0,06	-0,26	-0,36**	0,29*	0,34*	-0,23

** p< 0,01; * p< 0,05.

En los toros con valores de nivel medio de gris (EC3) > 88 se observó una relación positiva entre el % AH y el diámetro con el volumen del eyaculado (r=0,45 y 0,43, respectivamente). Asimismo, hubo una correlación positiva entre densidad y eyaculados con espermatozoides normales (r=0,54) (Tablas 11 y 12).

Tabla 11. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y volumen, concentración y movilidad espermática al tiempo 0 en toros con EC3 >88.

		Edad	EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm ²)
	n	25	25	25	25	25	25	25
Vol (ml)	r	0,45*	0,16	-0,55**	-0,60**	0,45*	0,43*	0,27
Conc (esp/mm³)	r	0,32	-0,36	-0,03	0,08	-0,14	-0,29	0,03
MM (0-5)	r	0,49*	-,011	0,06	0,05	-0,05	-0,07	-0,11
MI (%)	r	0,28	0,05	0,12	-0,09	0,17	0,11	-0,06

** p< 0,01; * p< 0,05.

Tabla 12. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y morfología espermática al tiempo 0 en toros con EC3 >88.

Morfología		Edad	EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm ²)
	n	25	25	25	25	25	25	25
Normal	r	0,19	0,11	-0,19	-0,17	0,05	-0,20	0,54**
Anorm. de cabeza	r	0,03	0,32	0,28	-0,21	0,32	0,34	-0,05
Anorm. de cola	r	-0,11	0,04	0,24	0,38	-0,12	-0,25	-0,13
GCP	r	-0,25	-0,03	0,18	0,20	-0,06	-0,15	-0,10
GCD	r	-0,07	0,08	0,09	0,18	0,00	0,00	-0,22
Otras anorm.	r	-0,19	-0,07	0,05	0,13	-0,10	-0,23	0,28
Acrosomas normales	r	-0,21	0,19	-0,03	-0,32	0,28	0,12	0,36

** p< 0,01; * p< 0,05.

Los eyaculados producidos por toros con densidad de AH/cm² ≤150 tuvieron menor porcentaje de espermatozoides normales y mayor porcentaje de anomalías de cabeza (p<0,05) (Tabla 13).

El nivel medio de grises estuvo relacionado con el volumen del eyaculado y con las anomalías de cabeza (Tabla 14).

Tabla 13. Calidad seminal en función de la Densidad ultrasonográfica.

Densidad		Vol (ml)	Conc. (esp/mm ³)	MM (0-5)	MI (%)	Norm	Cabeza	Cola	GCP	GCD	Otras	AcrNorm
≤150	n	38	38	38	38	35	35	35	35	35	34	35
	Media ±D.E.	5,12 ±2,11	936,84 ±418,60	4,13 ±0,91	82,24 ±14,96	68,40 ±18,85 ^a	6,43 ±8,39 ^a	10,68 ±9,20	10,11 ±13,81	1,74 ±3,48	4,44 ±7,90	80,43 ±11,06
>150	n	15	16	15	15	16	16	16	16	16	16	16
	Media ±D.E.	6,17 ±2,04	875,00 ±382,97	4,00 ±0,53	85,00 ±8,24	77,44 ±22,32 ^b	2,31 ±4,44 ^b	5,06 ±4,17	3,94 ±3,47	1,00 ±2,85	4,87 ±5,82	72,44 ±22,57
Total	n	53	54	53	53	51	51	51	51	51	50	51
	Media ±D.E.	5,41 ±2,12	918,52 ±405,77	4,09 ±0,81	83,02 ±13,39	71,23 ±20,22	5,14 ±7,58	8,92 ±8,35	8,18 ±11,90	1,51 ±3,29	4,58 ±7,24	77,92 ±15,81

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (p<0,05).

Vol= volumen; Conc.= concentración; MM= movilidad de masa; MI= movilidad individual; Norm= espermatozoides normales; Cabeza= anomalidades de cabeza; Cola= anomalidades de cola; GCP= gota citoplasmática proximal; GCD= gota citoplasmática distal; Otras= otras anomalidades; AcrNorm= acrosomas normales.

Tabla 14. Calidad seminal en función del nivel de grises (EC3).

EC3		Vol (ml)	Conc. (esp/mm ³)	MM (0-5)	MI (%)	Norm	Cabeza	Cola	GCP	GCD	Otras	AcrNorm
<80	n	20	21	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Media ±D.E.	4,67 ±1,61 ^a	971,43 ±482,33	4,15 ±0,99	78,25 ±18,30	72,75 ±14,66	9,35 ±8,62 ^a	9,40 ±11,24	5,65 ±6,51	2,15 ±4,17	3,10 ±7,74	83,95 ±8,60 ^a
80-100	n	27	27	27	27	25	25	25	25	25	24	25
	Media ±D.E.	6,30 ±2,26 ^b	864,81 ±351,32	4,11 ±0,58	86,85 ±6,672	71,72 ±24,12	2,08 ±4,21 ^b	8,36 ±6,22	8,56 ±14,11	0,76 ±1,42	5,75 ±7,20	74,76 ±19,42 ^b
>100	n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Media ±D.E.	3,92 ±1,20 ^a	975,00 ±376,50	3,83 ±1,17	81,67 ±13,663	64,17 ±20,22	3,83 ±9,39 ^b	9,67 ±5,35	15,00 ±14,80	2,50 ±5,17	4,83 ±5,71	71,00 ±12,55 ^b
Total	n	53	54	53	53	51	51	51	51	51	50	51
	Media ±D.E.	5,41 ±2,12	918,52 ±405,77	4,09 ±0,81	83,02 ±13,386	71,23 ±20,22	5,14 ±7,58	8,92 ±8,35	8,18 ±11,90	1,51 ±3,29	4,58 ±7,24	77,92 ±15,82

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (p<0,05).

Vol= volumen; Conc.= concentración; MM= movilidad de masa; MI= movilidad individual; Norm= espermatozoides normales; Cabeza= anomalidades de cabeza; Cola= anomalidades de cola; GCP= gota citoplasmática proximal; GCD= gota citoplasmática distal; Otras= otras anomalidades; AcrNorm= acrosomas normales.

No se encontró correlación entre las variables de Ecotext y los parámetros de calidad seminal a los 30 días posteriores a la ecografía (Tablas 15 y 16).

Tabla 15. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y volumen, concentración y movilidad espermática al tiempo 30.

		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm ²)
Volumen (ml)	n	38	40	40	39	40	40
	r	-0,14	0,12	0,16	-0,16	-0,19	0,14
Concentración (esp/mm)	n	44	46	46	45	46	46
	r	0,12	0,00	0,04	0,09	0,08	0,05
MM (0-5)	n	38	40	40	39	40	40
	r	0,14	-0,18	-0,01	0,021	-0,11	0,05
MI (%)	n	38	40	40	39	40	40
	r	0,08	0,03	0,10	-0,04	-0,22	0,18

** p< 0,01; * p< 0,05.

Tabla 16. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y morfología espermática al tiempo 30.

Morfología		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm ²)
Normal	n	14	16	16	15	16	16
	r	-0,02	0,05	0,29	-0,24	-0,24	0,34
Anorm. de cabeza	n	14	16	16	15	16	16
	r	-0,43	0,40	0,07	-0,10	-0,15	0,09
Anorm. de cola	n	14	16	16	15	16	16
	r	-0,39	-0,40	-0,27	0,15	0,32	-0,10
GCP	n	14	16	16	15	16	16
	r	0,04	-0,30	-0,28	0,05	0,36	-0,24
GCD	n	14	16	16	15	16	16
	r	-0,09	-0,44	-0,28	0,30	0,20	-0,23
Acrosomas normales	n	14	16	16	15	16	16
	r	0,19	-0,38	0,091	-0,188	-0,102	0,179

** p< 0,01; * p< 0,05.

A los 60 días posteriores al análisis ecográfico se observó una correlación positiva entre el Área y el Diámetro y la concentración espermática del eyaculado (r=0,33 y 0,35, respectivamente). (Tabla 17). No se encontraron correlaciones entre los otros parámetros.

Tabla 17. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y volumen, concentración y movilidad espermática al tiempo 60.

		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (μm)	Densidad (AH/cm ²)
Volumen (ml)	n	32	34	34	33	34	34
	r	0,04	-0,16	-0,22	0,24	0,13	-0,00
Concentración (esp/mm³)	n	46	48	48	47	48	48
	r	0,26	-0,07	-0,17	0,33*	0,35*	-0,28
MM (0-5)	n	32	34	34	33	34	34
	r	0,27	-0,06	0,28	-0,17	-0,33	0,31
MI (%)	n	32	34	34	33	34	34
	r	-0,03	0,33	0,10	0,36	0,06	0,08

* p< 0,05.

No se observó correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular con morfología espermática a los 60 días posecografía (Tabla 18).

Tabla 18. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y morfología espermática al tiempo 60.

Morfología		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (μm)	Densidad (AH/cm ²)
Normal	n	8	10	10	9	10	10
	r	0,30	-0,08	0,02	0,02	-0,25	-0,07
Anorm. de cabeza	n	8	10	10	9	10	10
	r	-0,59	0,37	0,39	-0,43	-0,44	0,39
Anorm. de cola	n	8	10	10	9	10	10
	r	0,19	-0,23	-0,12	0,27	0,37	-0,01
GCP	n	8	10	10	9	10	10
	r	-0,22	0,47	-0,06	-0,21	0,12	-0,06
GCD	n	8	10	10	9	10	10
	r	-	-	-	-	-	-
Acrosomas normales	n	8	10	10	9	10	10
	r	0,34	0,07	-0,20	-0,02	0,11	-0,63

4.6. Relación entre los parámetros de Ecotext y la movilidad posdescongelación

No se observó correlación entre los parámetros de Ecotext y la movilidad posdescongelación al tiempo 0 (Tabla 19).

Tabla 19. Correlación entre los parámetros de ecotextura y microestructura testicular y movilidad individual posdescongelación a tiempo 0.

Parámetro		MI posdescongelación (T=0) (%)
EC1	n	49
	r	-0,05
EC2	n	50
	r	-0,06
C3	n	50
	r	0,02
Área (%)	n	49
	r	-0,07
Diámetro (μm)	n	50
	r	-0,05
Densidad (AH/cm ²)	n	50
	r	0,09

Existieron correlaciones entre la movilidad posdescongelación y algunas variables de calidad del semen fresco: movilidad masal e individual ($r=0,47$ y $0,65$, respectivamente) y porcentaje de anomalías de cola ($r=-0,40$). (Tabla 20).

Se observaron diferencias significativas de densidad entre los toros que generaron pajuelas de buena calidad poscongelación (aprobadas) y aquellos que generaron pajuelas de baja calidad (desaprobadas) (Tabla 21).

Para el percentil de ecografías más ecogénicas ($EC3 > 80$), aparece una tendencia a una diferencia significativa en el nivel medio de grises de ecografías de toros de pajuelas de buena o mala calidad a la descongelación ($p=0,07$) (Tabla 22).

Tabla 20. Correlación entre los parámetros de calidad seminal precongelación y movilidad individual posdescongelación.

	Movilidad individual posdescongelación	
	Volumen (ml)	n
	r	0,17
Concentración (esp/mm ³)	n	53
	r	0,06
MM (0-5)	n	53
	r	0,47**
MI (%)	n	53
	r	0,65**
Normales	n	49
	r	0,17
Anormalidades de cabeza	n	49
	r	0,20
Anormalidades de cola	n	49
	r	-0,40**
GCP	n	49
	r	-0,25
GCD	n	49
	r	0,13
Otras	n	48
	r	-0,09
Acrosomas normales	n	49
	r	0,22

** p< 0,01; * p< 0,05.

Tabla 21. Correlación entre los parámetros de Ecotext y el destino de la pajuela (aprobada o desaprobada).

Destino pajuela		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm ²)
Aprobada	n	30	30	30	30	30	30
	Media	14,17	29,45	86,44	11,50	122,65	141,77
	±D.E.	±9,54	±36,29	±9,01	±2,69	±17,16	±15,39 ^a
Desaprobada	n	22	24	24	23	24	24
	Media	16,04	76,23	85,70	12,33	130,36	132,25
	±D.E.	±12,38	±150,86	±14,82	±4,18	±29,86	±19,20 ^b
Total	n	52	54	54	53	54	54
	Media	14,96	50,24	86,11	11,86	126,08	137,54
	±D.E.	±10,76	±105,58	±11,83	±3,40	±23,73	±17,67

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (p<0,05).

Tabla 22. Correlación entre los parámetros de Ecotext y el destino de la pajuela (aprobada o desaprobada) en toros con nivel de grises > 80.

Destino pajuela		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm²)
Aprobada	n	20	20	20	20	20	20
	Media ±D.E.	13,42 ±10,21	42,72 ±38,03	91,59 ±5,86*	10,29 ±1,95	113,94 ±11,48	148,12 ±13,10
Desaprobada	n	13	13	13	13	13	13
	Media ±D.E.	10,92 ±9,15	139,58 ±184,76	96,85 ±10,31*	9,85 ±3,23	109,46 ±16,06	145,31 ±12,80
Total	n	33	33	33	33	33	33
	Media ±D.E.	12,44 ±9,74	80,88 ±126,37	93,66 ±8,19	10,12 ±2,49	112,17 ±13,41	147,01 ±12,86

* p< 0,1.

No se observaron diferencias entre razas, en los resultados de la calidad posdescongelación a tiempo 0 (p>0,05). Con respecto a la edad, los eyaculados procedentes de toros de hasta 2 años a tiempo 0 tuvieron mayor proporción de pajuelas desaprobadas posdescongelación (66,6% vs 30,8%; p<0,05). Tomando el total de las congelaciones (T0, T30 y T60), no se observaron diferencias en el destino de las pajuelas entre eyaculados procedentes de toros de distintas edades.

Existieron diferencias significativas de % AH y Diámetro entre toros productores de eyaculados de buena calidad a la descongelación y eyaculados rechazados o no al tiempo 30 posecografía (Tabla 23).

Tabla 23. Correlación entre los parámetros de Ecotext y el destino de la pajuela (aprobada o desaprobada) a tiempo 30.

Destino pajuela		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (µm)	Densidad (AH/cm²)
Sin datos	n	14	14	14	14	14	14
	Media ±D.E.	10,68 ±9,24	40,07 ±53,36	87,93 ±10,07	10,31 ±1,86	115,10 ±15,01	140,95 ±18,09
Aprobada	n	37	38	38	37	38	38
	Media ±D.E.	16,42 ±11,08	56,49 ±121,52	86,08 ±12,45	12,21 ±3,63*	128,14 ±24,50*	137,03 ±17,64
Desaprobada	n	1	2	2	2	2	2
	Media ±D.E.	21,00 -	2,75 ±0,35	74,02 ±4,07	16,20 ±2,54*	163,75 ±3,96*	123,35 ±14,49
Total	n	52	54	54	53	54	54
	Media ±D.E.	14,96 ±10,76	50,24 ±105,58	86,11 ±11,83	11,86 ±3,40	126,08 ±23,73	137,54 ±17,67

* p< 0,05.

A T60 se observaron diferencias significativas de % ÁH y Diámetro entre toros productores de eyaculados de buena calidad a la descongelación y eyaculados rechazados o no ($p < 0,05$); (Tabla 24).

Tabla 24. Correlación entre los parámetros de Ecotext y el destino de la pajuela (aprobada o desaprobada) a tiempo 60.

Destino pajuela		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (μm)	Densidad (AH/cm ²)
Aprobada	n	31	32	32	31	32	32
	Media \pm D.E.	17,37 \pm 11,47	60,45 \pm 131,26	86,21 \pm 12,51	12,49 \pm3,70*	129,27 \pm25,00*	138,10 \pm 18,08
Desaprobada	n	1	2	2	2	2	2
	Media \pm D.E.	17,50 -	1,50 \pm 2,12	72,52 \pm 1,94	16,17 \pm2,51*	168,95 \pm3,39*	117,92 \pm 6,82
Total	n	52	54	54	53	54	54
	Media \pm D.E.	14,96 \pm 10,76	50,24 \pm 105,58	86,11 \pm 11,83	11,86 \pm 3,40	126,08 \pm 23,73	137,54 \pm 17,67

* $p < 0,05$.

Las pajuelas desaprobadas, procedían de animales en los que la ecografía realizada 60 días antes presentaba valores de % ÁH y Diámetro superiores a los recomendados.

4.7. Correlación entre parámetros de Ecotext y cantidad de pajuelas producidas

Fueron evaluados $17,69 \pm 5,80$ eyaculados por toro, obteniéndose en promedio $113,97 \pm 71,03$ pajuelas por eyaculado. No se observaron diferencias entre los parámetros de Ecotext de los toros que produjeron hasta 100 pajuelas, 101 a 150 pajuelas y más de 150 pajuelas por eyaculado (Tabla 25).

Tabla 25. Correlación entre los parámetros de Ecotext y la cantidad de pajuelas producidas por eyaculado.

Pajuelas por eyaculado		EC1	EC2	EC3	Área (% AH)	Diámetro (μm)	Densidad (AH/cm ²)
≤ 100	n	17	18	18	17	18	18
	Media \pm D.E.	17,73 \pm 11,47	32,11 \pm 50,52	84,35 \pm 11,45	12,25 \pm 2,960	128,01 \pm 23,69	138,58 \pm 20,71
101-150	n	14	14	14	14	14	14
	Media \pm D.E.	13,39 \pm 10,86	51,61 \pm 112,25	87,51 \pm 13,88	11,62 \pm 3,77	124,50 \pm 27,48	137,79 \pm 19,80
> 150	n	11	11	11	11	11	11
	Media \pm D.E.	16,95 \pm 11,37	38,45 \pm 56,00	85,35 \pm 9,70	12,50 \pm 3,59	126,41 \pm 19,91	137,48 \pm 11,84
Total	n	42	43	43	42	43	43
	Media \pm D.E.	16,08 \pm 11,14	40,08 \pm 75,84	85,64 \pm 11,70	12,11 \pm 3,35	126,46 \pm 23,61	138,04 \pm 18,12

4.8. Valor predictivo de los parámetros de Ecotext

Se utilizó un modelo de regresión logística multinomial para comprobar cuál o cuáles de los datos de Ecotext podría/n tener un valor predictivo respecto al resultado de la congelación al tiempo 0.

Respecto a densidad, se tomó como valor de corte 115 AH/cm², ya que no se encontraron valores inferiores a 100. Respecto a la edad, se tomaron los siguientes grupos: hasta 2 años, >2 y <5 años y ≤5 años. El resultado expresa que la Densidad de AH y la edad del toro son los parámetros incluidos en el modelo que participan de manera significativa (p<0,05). La raza no fue una variable significativa en el modelo (p=0,12). Sin embargo, con la prueba de Wald no se puede rechazar la hipótesis nula respecto a la edad (no influencia la edad), por lo que queda como única variable la densidad de AH (p<0,01). El análisis de regresión indica una fuerte relación entre densidad y congelabilidad (exp B=5,6 x 10⁻⁹).

Para la predicción de animales productores de eyaculados no congelables, utilizando un valor de corte ≤115 AH/cm² se observó una sensibilidad del 33,3% (6/18) y una especificidad del 100% (25/25) (Tabla 26).

Tabla 26. Tabla de contingencia destino de pajuela y densidad a tiempo 0.

		Destino pajuela		Total
		Aprobada	Desaprobada	
Densidad	≤115 AH/cm ²	0	6	6
	>115 AH/cm ²	25	12	37
Total		25	18	43

Todos los toros con valor de densidad ≤115 AH/cm² tuvieron semen no congelable, o lo que es lo mismo, pajuelas desaprobadas.

5. Discusión

La ultrasonografía reproductiva en el toro representa una herramienta con un gran potencial, por tratarse de una técnica no invasiva y atraumática que permite evaluar la estructura y funcionalidad del aparato reproductor (*Chapwanya y col., 2008; Eilts y Pechman, 1988; Ginther, O.J. 1998; Gnemmi y Lefebvre, 2009; Gnemmi y Lefebvre, 2010; Gnemmi, G., 2006; Hahn, J. 1999; Kastelic y Brito, 2012; Pinho y col., 2012; Rault, P., 2006*). Su aplicación puede ser particularmente útil en la evaluación de reproductores dadores de semen en CCPS, como un componente de predicción de fertilidad y eficiencia en la producción de pajuelas. En este sentido, esta línea de investigación aporta originalidad al incorporar nuevos parámetros de ecotextura, en especial aquellos que estiman el porcentaje, área y diámetro de las áreas hipocogénicas.

Los valores de ecotextura testicular expresados en niveles medios de grises (EC3) obtenidos en el presente estudio se corresponden con imágenes homogéneas y de hipocogenicidad moderada, coincidentes con los resultados de trabajos previos realizados en toros *Bos taurus* de razas carniceras (*Abdel-Razek y Ali., 2005; Pinho y col., 2012 y 2013*). Echegaray y col. (2018 a) describieron valores de EC3 similares en toros de razas lecheras. En tanto Silva y col. (1997) y Carmo y col. (2012) reportaron una intensidad de píxeles promedio mayor (imágenes más ecogénicas) en toritos *Bos indicus* menores a 2 años (163,7 y 115,3 respectivamente). Esta variación entre un grupo de trabajo y otro puede ser atribuida a diferencias en la edad y en el biotipo de los animales incluidos, además de las posibles discrepancias en la calibración y tipo de los equipos y en la metodología empleada (*Pinho y col. 2013*).

Con respecto a la edad, está descripto que la ecogenicidad aumenta a medida que el animal madura sexualmente (*Aravindakshan y col., 2000; Cardilli, D.J., 2014; De Souza, C.C., 2016*) y luego no cambia significativamente con los años más allá de la pubertad (*Brito, L.F.C., 2012, Hamm y Fobbe, 1995*). Una de las razones de la menor ecogenicidad de las imágenes testiculares en los animales prepúberes es la presencia de secciones transversales de túbulos seminíferos sin células germinales o con células inmaduras (*Evans y col., 1996*). Incluso se ha sugerido el uso de la ecotextura testicular como indicador de la precocidad sexual (*Cardilli, D.J., 2014; De Souza, C.C., 2016*). En el presente trabajo no se hallaron diferencias en la ecotextura testicular de los toros en función de la edad, dentro del rango de 1,5 a 10 años, coincidente con Brito, L. F.C. (2012) y Hamm y Fobbe (1995).

Tampoco hubo diferencias en la ecogenicidad entre razas. Cabe señalar que la cantidad de animales incluidos en algunas de las razas o rangos etarios fue baja y que todos los individuos evaluados tenían más de 15 meses de edad, razón esta última que explicaría la mayor homogeneidad de este parámetro en los reproductores del presente trabajo, sumado a que se trata de una población de toros dadores de semen en actividad, sin patologías.

No se hallaron diferencias en la ecotextura entre los testículos izquierdo y derecho, al igual que en los trabajos de Aravindakshan y col. (2000), Cardilli y col. (2009) y Pinho y col. (2013).

Entre los factores que definen la ecotextura del parénquima testicular se destacan la densidad y diámetro de los túbulos seminíferos y las características del contenido de los mismos (Evans y col., 1996), factores que varían con el estado funcional de los testículos. En estudios histológicos del parénquima testicular en porcinos realizados recientemente se ha encontrado una correlación elevada entre la densidad de áreas hipocogénicas (AH) estimada por ecografía y la presencia de grandes túbulos seminíferos ($r=0,71$) (Muñoz, I., 2016). No obstante, la densidad de AH es inferior a la densidad total de túbulos medida por histología, donde aparecen en torno a 1000 cortes de túbulo/cm², comparado con 150 a 200 AH/cm² que identifica Ecotext. Pero cuando se cuentan por histología los cortes de estructuras *tubulares* superiores a 300 μm de diámetro, su densidad es similar a la de las AH vistas por ecografía (Muñoz, I., 2016). Cabe recordar que el diámetro tubular en los bovinos tiene un rango de 63 a 351 μm (Brito y col. 2012; Terrabuio Andreussi y col., 2014, Triparthi y col. 2015). Estas evidencias hacen pensar que las AH podrían ser el reflejo ecográfico de aquellas zonas en las que los haces de ultrasonido cortan a los túbulos de mayor diámetro. Es por eso que se incorporó en el software tres parámetros de microestructura que estiman el área, diámetro y densidad de los túbulos seminíferos.

La correlación negativa entre el nivel medio de grises (EC3) y el diámetro de los túbulos y el porcentaje de AH ($r= -0,87$ y $r=-0,84$, respectivamente) es coincidente con resultados anteriores (Brito, L.F.C., 2012; Gabor y col., 1998). En contraste, la EC3 tuvo una correlación positiva moderada con la densidad de los túbulos estimada por ecografía ($r=0,54$). Analizando la distribución de los valores de densidad en función de EC3 se advirtió que la curva adoptó una forma de “u” invertida y tomando el percentil de datos

de EC3 >88 se observó una correlación negativa con la densidad ($r=-0,61$). La subpoblación de datos con EC3 >88 excluye a las imágenes oscuras o subexpuestas, que son las que generan la correlación positiva de EC3 con la densidad.

La inclusión de los parámetros EC1 y EC2 en el software permitió evaluar nuevas asociaciones entre la ecotextura y la estructura del parénquima testicular. Se comprobó una correlación positiva moderada entre EC1 y el diámetro de los túbulos seminíferos ($r=0,56$) y el porcentaje de AH ($r=0,65$) estimadas por ultrasonografía, que se mantuvo en el percentil de datos de EC3 >88 ($r=0,47$ y $r=0,71$), en el que se observó también una correlación positiva con la densidad de AH ($r=0,60$). Estos resultados indicarían una asociación entre la cantidad de pixeles negros medidos en el ultrasonograma y el diámetro y densidad tubular. La relación se pierde si aparece “ruido” debido a la presencia de otros factores que aumentan la cantidad de pixeles negros, como mal contacto, edema o disminución de densidad celular en el parénquima.

Por otra parte, se observaron correlaciones negativas de EC2 con el porcentaje de AH ($r= -0,68$) y con el diámetro de los túbulos ($r=-0,74$) y una correlación positiva moderada entre EC2 y la densidad de AH ($r=0,53$). La correlación positiva de EC2 con la densidad de AH no es coincidente con los resultados de trabajos anteriores del mismo grupo (Echegaray y col., 2018 b). Nuevamente, en el percentil de datos de EC3 >88, las correlaciones entre EC2 y porcentaje de AH, diámetro y densidad de los túbulos fueron negativas ($r=-0,62$, $r=-0,54$ y $r=-0,47$ respectivamente).

En cuanto a la relación entre la ecotextura y la funcionalidad del parénquima testicular, se observó una asociación de los parámetros de Ecotext con la morfología espermática, no así con parámetros de movilidad.

Las principales anomalías espermáticas halladas en los eyaculados analizados fueron morfoanomalías de cabeza (vacuolas y cráteres, piriformes, acintadas, macro y microcefalia), seguidas por anomalías de cola, GCP y GCD. Las anomalías de cabeza han sido relacionadas con problemas de fertilidad (Nothling y Arndt, 1995; Parkinson, T.J., 2004; Petac y Kosec, 1989; Soderquist y col., 1991; Wilmington, J.A., 1981), al igual que la GCP (Soderquist y col., 1991; Linford y col., 1976; Saacke y col., 1995). Es importante resaltar que los toros incluidos en el estudio eran dadores activos de semen de fertilidad normal.

Se obtuvo una correlación negativa moderada entre EC3 y el porcentaje de cabezas anormales de los espermatozoides ($r=-0,52$) y entre EC3 y el porcentaje de acrosomas normales ($r=-0,36$). Es decir, los toros con ecotextura testicular más ecogénica produjeron eyaculados con mayores anomalías de cabeza y menor porcentaje de acrosomas normales. Brito y col. (2012) también encontraron una correlación negativa entre la intensidad de píxeles y la morfología espermática. En estudios realizados con el mismo software se encontró una correlación positiva de EC3 con el porcentaje de anomalías espermáticas en porcinos (Muñoz y col., 2018) y con el porcentaje de anomalías mayores (cabeza, pieza intermedia y gota citoplasmática proximal) en ovinos (Escartin y col., 2018). En contraste, Kastelic y col. (2001) hallaron una correlación negativa entre la ecotextura y el porcentaje de anomalías espermáticas evaluando toritos Holstein de 16 meses. Brito y col. (2003) no hallaron asociación entre ambas variables en toros *Bos indicus* y cruce *Bos indicus* x *Bos taurus*.

También se halló una correlación negativa baja entre EC2 y el porcentaje de anomalías de cabeza ($r= -0,37$).

Es importante destacar que los valores de correlación de ecotextura y funcionalidad testicular, si bien significativos, son inferiores a aquellos que asocian la ecotextura con la estructura del parénquima testicular.

Con respecto a la relación entre los parámetros de microestructura ultrasonográfica (alta resolución) y la funcionalidad del parénquima testicular a T0, la densidad de AH estuvo asociada negativamente con el porcentaje de anomalías de cabeza ($r=-0,37$) y positivamente con el volumen seminal ($r=0,32$). Un trabajo en el que se utilizó el mismo software en toros Holstein se demostró una baja correlación negativa entre la densidad y el porcentaje de anomalías mayores ($r=-0,34$) y una correlación positiva entre la densidad y el número de espermatozoides móviles ($r=0,65$) y el número de espermatozoides normales ($r=0,63$); (Gnemmi y col., 2018). Es decir, ambos trabajos coinciden en que los toros cuyas imágenes testiculares tuvieron valores de densidad más elevados, produjeron eyaculados con mayor proporción de espermatozoides normales. También fueron descritas bajas correlaciones negativas de la densidad de AH con los porcentajes de anomalías totales ($r=-0,38$), de anomalías de pieza intermedia ($r=-0,39$), de gota citoplasmática distal ($r= -0,35$) y de cola ($r=-0,32$) en carneros (Muñoz y col., 2018).

El porcentaje de AH y el diámetro tubular a T0 estuvieron positivamente correlacionados con el porcentaje de anomalías de cabeza ($r=0,46$ y $r=0,50$, respectivamente) y con el porcentaje de acrosomas normales ($r=0,29$ y $r=0,34$, respectivamente). El porcentaje de AH y el diámetro estuvieron negativamente asociados con el porcentaje de anomalías de pieza intermedia ($r=-0,40$ y $-0,34$) y con el porcentaje de anomalías mayores ($r=-0,39$ y $-0,35$) en carneros (Muñoz y col., 2018).

Los valores de correlación entre los parámetros de microestructura y funcionalidad del parénquima son moderados a bajos (no superan el 50%), lo que reduciría su potencial como predictor de fertilidad.

La falta de correlación de los parámetros de Ecotext con la mayoría de las variables de calidad seminal a T0 es coincidente con otros trabajos, que concluyeron que la ecogenicidad está más asociada con características del eyaculado 2-4 semanas después de la evaluación ultrasonográfica (Ahmadi y col., 2012; Arteaga y col., 2005; Brito, L.F.C., 2012). Se ha reportado que la presencia de anomalías espermáticas puede responder a disturbios de la función testicular ocurridos un tiempo antes (Barth y Oko, 1989; Vogler y col., 1991). La evaluación de la calidad seminal 30 y 60 días posteriores al análisis ultrasonográfico del parénquima testicular realizada en el presente trabajo se justifica por la duración de la espermatogénesis y el tiempo hasta la aparición en el eyaculado de los espermatozoides presentes en los túbulos. No se encontró asociación entre los parámetros de Ecotext y calidad seminal a los 30 días posteriores a la ecografía. En tanto que a los 60 días posteriores al análisis ecográfico se observó una correlación positiva entre el porcentaje de AH y el diámetro de los túbulos seminíferos y la concentración espermática del eyaculado ($r=0,33$ y $r=0,35$ respectivamente), lo que demuestra un moderado grado de asociación entre los parámetros de alta resolución y la concentración espermática de los eyaculados obtenidos dos meses más tarde. No se encontraron correlaciones entre los otros parámetros y la calidad seminal.

Otro aspecto considerado en el análisis de este estudio fue el efecto de las condiciones del parénquima testicular de los toros evaluadas por ultrasonografía y la calidad seminal posdescongelación de las pajuelas elaboradas a partir de eyaculados de los mismos, a T0, T30 y T60. La calidad seminal posdescongelación no se vio alterada por el estado del parénquima testicular evaluado por US hasta los 60 días que aproximadamente dura la espermatogénesis. Con respecto a la edad, los eyaculados

procedentes de toros de menos de 2 años a T0 tuvieron mayor proporción de pajuelas desaprobadas posdescongelación. No obstante, considerando el total de las congelaciones (T0, T30 y T60), no se observaron diferencias en el destino de las pajuelas entre eyaculados procedentes de toros de distintas edades. Una de las posibles causas de la pérdida de las diferencias en la proporción de pajuelas desaprobadas al extender el plazo de evaluación de la calidad seminal a T30 y T60 podría ser el efecto de mayor edad (1 y 2 meses más) en los animales más jóvenes sobre la madurez sexual.

Si bien existieron correlaciones lógicas entre la movilidad posdescongelación y algunas variables de calidad del semen fresco, como las movilidades masal e individual ($r= 0,47$ y $0,65$ respectivamente) y el porcentaje de anomalías de cola ($r= -0,40$), no se encontraron asociaciones entre los parámetros de Ecotext y la movilidad posdescongelación al tiempo 0. Para el percentil de ecografías más ecogénicas (EC3> 80), aparece una tendencia a una diferencia significativa en el nivel medio de grises de ecografías de toros de pajuelas de buena o mala calidad a la descongelación. Sí se observaron diferencias significativas en la densidad tubular entre los toros que generaron pajuelas de buena calidad posdescongelación (aprobadas) y aquellos que generaron pajuelas de baja calidad (desaprobadas), lo que establece la importancia predictiva de este parámetro.

Existieron diferencias significativas del porcentaje de AH y diámetro entre los toros productores de eyaculados de buena calidad a la descongelación y eyaculados rechazados a T30 y T60. Las pajuelas desaprobadas, procedían de animales en los que la ecografía realizada 30 y 60 días antes presentaba valores de porcentaje de AH y de diámetro superiores a los recomendados ($>15\%$ y $>150 \mu\text{m}$, respectivamente) (*Ecotext*).

No se observaron diferencias entre los parámetros de Ecotext de los toros que produjeron hasta 100 pajuelas por eyaculado, 101 a 150 pajuelas por eyaculado y más de 150 pajuelas por eyaculado. Contrariamente, Brito, L.F.C. (2012) encontró que la ecogenicidad testicular se correlacionó positivamente con la producción diaria total de espermatozoides (total y por gramo de testículo).

El modelo de regresión logística multinomial expresó que la densidad de AH a la ultrasonografía fue el único parámetro incluido en el modelo que tuvo valor predictivo respecto al destino de las pajuelas elaboradas al momento del análisis ultrasonográfico (T0). Con el valor de corte de $\leq 115 \text{ AH/cm}^2$ dio una sensibilidad del 33,3% y una

especificidad del 100% para determinar que el semen no será congelable. Todos los toros con valores ≤ 115 AH/cm² tuvieron semen no congelable (pajuelas desaprobadas). Un trabajo anterior realizado con Ecotext evaluando testículos postmortem estableció una sensibilidad del 100% y una especificidad del 42,9% de la densidad de AH como predictora de la calidad de la muestra obtenida de epidídimo (*Echegaray y col., 2018 a*). Si bien se utilizaron el mismo equipo y software, la metodología fue diferente. En porcinos, con un valor de corte apropiado para la especie (80 AH/cm²), la especificidad fue superior (sensibilidad 100% y especificidad 83,5%) (*Muñoz y col., 2018*). Por su parte, *Arteaga y col. (2005)*, analizando la capacidad predictora de la ecotextura respecto a los eyaculados con un porcentaje elevado de anormalidades (>30%), encontraron una sensibilidad del 60% y especificidad de 33%. La capacidad predictora de la variable de ecotextura empleada depende del valor de corte elegido y del criterio utilizado para definir la variable dependiente. En el caso del presente trabajo, la aprobación o desaprobación de las pajuelas fue definida por atributos de movilidad, además de la morfología espermática. Quizás esta puede ser una razón de la menor sensibilidad. En los trabajos citados del mismo grupo (*Echegaray y col., 2018; Muñoz y col., 2018*) definieron como variable respuesta el porcentaje de anormalidades espermáticas. En carneros, el parámetro más predictivo de calidad seminal fue el porcentaje de AH, con valores de corte inferior a 6,5% y superior a 13%, obteniendo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 77,4% (*Escartin y col., 2018*).

6. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir lo siguiente:

- Algunos parámetros de Ecotext presentan distintos niveles de correlación con la estructura y funcionalidad del parénquima testicular, en especial con la morfología espermática.
- La densidad de AH es un predictor del resultado de la congelación a tiempo 0.
- Hay diferencias en el porcentaje de AH y diámetro entre toros que producen eyaculados aptos y no aptos a los 30 y 60 días posecografía.
- No hay diferencias en los valores de Ecotext entre toros que producen distinta cantidad de pajuelas.

No obstante haberse demostrado distintos niveles de asociación entre los parámetros de Ecotext y la calidad seminal, es necesario continuar con los estudios a los efectos de comprobar la utilidad de esta herramienta en la predicción de la fertilidad potencial de los toros dadores de semen de CCPS.

7. Perspectivas

Los desafíos inmediatos para el futuro en esta área de trabajo son los siguientes:

- 1) Incluir una mayor cantidad de toros en los análisis a los efectos de fortalecer los grupos etarios y raciales.
- 2) Comparar la información con datos procedentes de toros de razas lecheras.
- 3) Posibilitar el uso del software Ecotext® en otros equipos de ultrasonido.

8. Bibliografía

- Abdel-Razek, A.Kh.; Ali, A. (2005). Development changes of bull (*Bos taurus*) genitalia as evaluated by caliper and ultrasonography. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, p.23-27.
- Ahmad, N. N., D. E.; Subandrio, A. L. . (1991). B-Mode real time ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of sheep and goat. *The Veterinary Record* **128**, 491-496.
- Ahmadi, B., Pik-Shan Lau, C., Giffin, J., Santos, N., Hahnel, A., Raeside, J., Christie, H., Bartlewski, P. (2012). Suitability of epididymal and testicular ultrasonography and computerized image analysis for assessment of current and future semen quality in the ram. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* **237**, 186-193.
- Amann, R. P. (1962). Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *Am J Anat.* , 49-67.
- Amann, R. P., and Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**, 5-17.
- Aponte PM, van Bragt, M.P., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M. (2005). Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS* **113**: 727-742.
- Aravindakshan, J. P. H., A.; Bartlewski, P. M.; Beard, A. P.; Pierson, R. A.; Rawlings, N. C. (2000). Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. . *Theriogenology* **54**, 339-354.
- Arteaga, A. A., Barth, A. D., and Brito, L. F. (2005). Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology* **64**, 408-15.
- Barth, A. D. (2001). Evaluation of sperm motility in bull breeding soundness evaluations. . *Society for Theriogenology* **24**, 4-5.
- Barth, A. D., Alisio, L., Aviles, M., Arteaga, A. A., Campbell, J. R., and Hendrick, S. H. (2008). Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. *Anim Reprod Sci* **106**, 274-88.
- Barth, A. D. and Oko, R.J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. *Iowa State University Press, Ames, Iowa 50010*.
- Bearden, H. J. a. J. W. F. (1997). *Applied Animal Reproduction. 4thed. Prentice Hall. New York*.
- Bellows, D. S., Ott, S. L., & Bellows, R. A. (2002). Review: Cost of Reproductive Diseases and Conditions in Cattle *Professional animal scientist*.
- Boggs, D. a. H., E. (1997). Cow/Calf Analysis: Key Indicators of Profitability. *Range Beef Cow Symposium*.
- Brito, L.F.C., Silva, A., Rodrigues, L., Vieira, F., Deragon, L., Kastelic, J. (2002). Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. . *Anim Reprod Sci* **70**, 181-190.
- Brito, L.F.C., Silva, A.E., Barbosa, R.T., Unanian, M.M., Kastelic, J.P. (2003). Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. *Anim Reprod Sci*;79:1–15
- Brito, L. F. C. B., A.D.; Wilde, R.E. et al. . (2012). Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production, and quantitative testicular histology in beef bulls. *Theriogenology* **78**, 69-76.
- CABIA (2018). Movimiento anual de dosis de semen bovino. Año 2018. *Taurus* **21**, 36-37.

- Cardilli, D.J.; Toniollo, G.H.; Pastore, A.A. (2009). Ultrasonographic study of testicular development in young Nelore bulls raised in extensive management system. *Animal Reproduction*, v.6 (Suppl.1), p.252.
- Cardilli, D. J. T., G.H.; Pastore, A.A. et al. (2014). Precocidade sexual em bovinos Nelore avaliada por ultrassonografia testicular. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 1296-1298.
- Carmo, A.S., Osorio, J.P., Mendonça, L.F., Lago, L.A., Henry, M. (2012). Aspectos biométricos y ultrasonográficos del desarrollo testicular en bovinos de la raza guzerat (*Bos taurus indicus*). *Rev Cienc Anim* 5, 51-62.
- Chandolia, R. K., Honaramooz, A., Omeke, B.C., Pierson, R.A., Beard, A.P., Rawlings, NC. (1997). Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology* 48, 119-132.
- Chapwanya, A., Callanan, J., Larkin, H., Keenan, L., and Vaughan, L. (2008). Breeding soundness evaluation of bulls by semen analysis, testicular fine needle aspiration cytology and trans-scrotal ultrasonography. *Ir Vet J* 61, 315-8.
- Coulter, G. H. M., R.J., Kozub, G.C. (1987). WF Cates Scrotal circumference of 2 years old bulls of several breeds. *Theriogenology* 27, 485.
- Davis, J. R., Langford, G.A., Kirby, P.J. (1970). The testicular capsule. In *AD Johnson, WR Gomes & NL VanDemark (Eds.) The Testis*. New York, NY: Academic Press., 282-337.
- De Souza, C. C. (2016). Análises ultrasonográficas associadas a histología testicular de touros jovens Nelore. *Tesis de Maestría en Ciencia Animal*. Universidad Federal de Mato Grosso do Sul.
- Decuadro-Hansen, G. (2000). Fertilidad de los toros de inseminación artificial: factores de variación. *Taurus* 2, 20-34.
- DesCôteaux, L. G., Gnemmi, G. and Colloton, J. (2010). *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography*. Wiley-Blackwell, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA.
- Dumont, P. (1998). Appreciation of précocité sexuelle et du taureau intériât pour la reproduction in Mount naturelle ou in insémination artificielle. *Elev. et INSEM*, 3-24.
- Dyce, K. M., Sack, W.O. and Wensing, C.J.G. (1990). *Tratado de Anatomia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Echegaray, A. M., S.; Maraboli, CX.; Muñoz, I.; Escartín, N.; Gnemmi, G. (2018). New echotexture parameters to evaluate the testicular parenchyma in bulls. *Reproduction in domestic animals* 53.
- Echegaray, A.; Aventín, S.; Muñoz, I.; Marcantonio, S.; Escartín, N.; Gnemmi, G. (2018). Relationship between the echotexture of testicular parenchyma and the quality of spermatogenesis in bulls. *Animal*, [Volume 12, Supplement s1 \(Theory to Practice - International Bull Fertility Conference 27–30 May 2018, Westport, Ireland\)](#)
- Ecotext. Manual de instalación y utilización. Humeco. www.humeco.net/ecotext.
- Eilts, B. E., and Pechman, R. D. (1988). B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology* 30, 1169-75.
- Eilts, B. E. a. P., R.D. (1988). B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology* 30, 1169-1175.
- Ericsson, S. A. G., D.L., Thomas, C.A., Downing, T.W., Marshall, C.E. (1993). Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 39, 1009-1024.

- Escartin, N., Muñoz, I., Gil, A., Echegaray, A. 2018. New echotexture parameters to evaluate the testicular parenchyma in rams. *Reproduction in domestic animals* 53.
- Evans, A. C. O., Pierson, R.A., Garcia, A., McDougall, L.M., Hrudka, F., Rawlings, N.C. (1996). Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology* 46, 345-357.
- França LR, R. L. (1998). The testis of domestic animals. *In: Regadera J, Martinez-Garcia F, editors. Male reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid.* 197-219.
- Gabor, G., Sasser, R. G., Kastelic, J. P., Mezes, M., Falkay, G., Bozo, S., Csik, J. V., Barany, I., Hidas, A., Szasz, F., Jr., and Boros, G. (1998). Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. *Theriogenology* 50, 223-8.
- Galotta, J. M. (2009). Anatomía II. *Guía de la Cátedra de Anatomía de la Fac. Cs. Veterinarias UBA.*
- Genedy, T.M.; Seham, S. Hadad, Emad, M. Abd El-Razek. (2019). Ultrasonographic, Morphometric and Histological Study of Testicular Parameters in Egyptian Water Buffalo Bulls (*Bubalus Bubalis*). *Journal of Advanced Veterinary Research* Volume 9, Issue 3 (2019) 117-122.
- Ghoshal, G. O., M.L.; O'Brien, W.D.O. Jr. (2013). Quantitative ultrasound history and successes. *In J Mamou & ML Oelze (Eds.), Quantitative Ultrasound in Soft Tissues*, 21-42.
- Ginther, O. J. (1986). Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. *Ed Equiservices* 3rd Ed.
- Ginther, O. J. (1995). Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Fundamentals. *Book 1. Equiservices Publishing, 1995.*
- Ginther, O. J., Lofstedt, R.M., Ireland, W.P. (1998). Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Cattle. *Cross Plains, WI: Equiservices Publishing*, 304.
- Ginther, O. J. K., L.; Kastelic, J.P. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 41, 247-254.
- Gnemmi, G., and Lefebvre, R. C. (2009). Ultrasound imaging of the bull reproductive tract: an important field of expertise for veterinarians. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25, 767-79.
- Gnemmi, G., and Lefebvre, R. C. (2010). Bull anatomy and ultrasonography of the reproductive tract. *In Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography.*, 143-162.
- Gnemmi G., B. S., Necchi D., Maraboli C. (2006). Ultrasonography of genital tract of the bull. Field experiences. *24th WBC 15-19 October 2006.*
- Gnemmi, G. M., C.; Escartin, N.; Muñoz, I.; Marcantonio, S. and Echegaray, A. (2018). Interest in the study of the echotexture of the testicular parenchyma to evaluate the maturity of young bulls. *Animal* 12.
- Goddard, P. J. (2000). Principios Generales. *Ecografía Veterinaria. Ed. Acribia.*
- Goiozo PF, D. S. G., Lima JP, Lima MC, Amorim RL, Bandarra EP. (2005). Alterações Testiculares em Bovinos da Raça Nelore (*Bos taurus indicus*) Criados no Centro-Oeste Brasileiro. *Rev CFMV* 2005, 58-62.
- Hafez, E. S. E. (2000). Anatomy of male reproduction. *In ESE Hafez & B Hafez (Eds.), Reproduction in Farm Animals (7 th ed.)*
- Hafez, L. (1989). Bases biológicas de la reproducción bovina. *Ed. Labor S.A.*, 464.
- Hahn, J., Stouffer, J.R. and Foote, R.H. (1999). Ultrasonographic and other testicular characteristics of Holstein bulls revisited. *J. Reprod. Dev.* 45, 405-410.

- Hamm, B. y Fobbe, F., F. (1995). Maturation of the testis: Ultrasound evaluation. *Ultrasound in Medicine & Biology* 21, 143-147.
- Harder, R. R., Lunstra, D. D. and Johnson, R. K. (1995). Growth of testes and testicular morphology after eight generations of selection for increased predicted weight of testes at 150 days of age in boars. *Journal of Animal Science* 73, 2186-2192.
- Higdon, H. L. I., Spitzer, J.C., Hopkins, F.M., Bridges, W.C. Jr. (2000). Outcomes of breeding soundness evaluation of 2898 yearling bulls subjected to different classification systems. . *Theriogenology* 53, 1321-1332.
- Hopkins, F. M. a. S., J.C. (1997). The new Society for Theriogenology breeding soundness evaluation system. . *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 13, 283-293.
- Hunt, J. W., Worthington, A.E. and Kerr, A.T. (1995). The subtleties of ultrasound images of an ensemble of cells: simulation from regular and more random distributions of scatterers. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 21, 329-341.
- Inchaisri, C., Jorritsma, Vos PL, R., van der Weijden, GC, Hogeveen, H. (2010). Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle. . *Theriogenology* 74, 835-846.
- Kastelic, J. P., and Brito, L. F. (2012). Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reprod Domest Anim* 47 45-51.
- Kastelic, J. P., and Thundathil, J. (2008). Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 368-373.
- Kastelic JP, Cook RB, Pierson RA, Coulter GH. (2001). Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. *Can J Vet Res* 65, 111-115.
- Kumar, S. C., R.K.; Kumar, R.; Soni, N.; Pandey, A.K.; Magotra, A. and Malik, Z. (2018). Ultrasonographic examination of testicular development in Harnali lambs. *The Pharma Innovation Journal* 7, 585-588.
- Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C., Stewart, D.L. (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J Reprod Fertil* 1976;47:283-91.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? . *Journal of Dairy Science* 84, 1277-1293.
- Magalhães, F.F., de Souza, M.B.; Machado da Silva, L.D. (2019). Testicular ultrasound evaluation in small animal practice. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, Recife, v.13, n.1 (jan-mar), p.126-135, 2019.
- Marcantonio, S. (1990). Comercialización de semen bovino: análisis de los últimos años. *Rev. CABIA* 20, 8-13.
- Miskin, M. a. B., J. (1974). B-mode ultrasonic examination of the testes. *Journal of Clinical Ultrasound* 2, 307-311.
- Moce, E., and Grahamb, J. K. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. . *Animal Reproduction Science* 105, 104-118.
- Muñoz, I. (2016). Determinación de la validez de la biomicroscopía ultrasónica como método de análisis de la función testicular en verraco”. Trabajo de Fín de Grado. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad de Zaragoza.
- Muñoz, I., Escartin, N., Zamora, A., Echegaray, A. 2018. New echotexture paramaters to evaluate the testicular parenchyma in boars. *Reproduction in domestic animals* 53.
- Nothling, J.O., Arndt, E.P. (1995). Fertility of two bulls with poor sperm morphology. *J South Afric Vet Assoc* 1995;66:74-6.

- Parkinson, T.J. (2004). Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Vet J* 2004;168:215–29)
- Paschoal, A.F.L.;Santos, J.T.; Mellagi, A.P.G.; Bernardi, M.L.; Wentz, I.; Bortolozzo, F.P. (2019). Use of testicular tone and echogenicity in identifying boars with low sperm quality [Uso de tónus e ecogenicidade testiculares na identificação de reprodutores suínos com baixa qualidade espermática. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.71, n.4, p.1277-1285.
- Pasha, R.H., Qureshi, A.S., Lodhi, L.A. and Jamil, H. (2011). Biometric and ultrasonographic evaluation of the testis of one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Pak Vet J*, 31(2): 129-133.
- Pechman, R. D. a. E., B.E. (1986). B - Mode Ultrasonography of the Bull Testicle. *Theriogenology* 27, 431-441.
- Perkins, T. (2000). Uso del ultrasonido en la clasificación de la canal y evaluación reproductiva. *Primer congreso nacional de la raza cebú. Revista El Cebú*.
- Petac, D., Kosec, M. (1989). Some morphological characters of bull spermatozoa and their effect on fertility. *Veterinarstvo* 1989;26:65–72.
- Pierson, R. A., and Adams, G. P. (1995). Computer-Assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bed fellows. . *Theriogenology* 43, 105-112.
- Pierson, R. A. K., J.P. and Ginther, O.J. (1988). Basic principles and techniques of transrectal ultrasonography in cattle and horses. *Theriogenology* 29, 3-20.
- Pinho, R. O., Sampaio Costa, D., Siqueira, J.B., Yukio Chaya, A., Miranda Neto, T., Martins, L.F. Guimarães; S.E.F., Guimarães, J.D. (2012). Testicular echotexture and seminal quality of young Montana Tropical Compound bulls classified as sound and unsound for breeding. *R. Bras. Zootec* 41, 1961-1965.
- Pinho, R.O., Sampaio Costa, D., Siqueira, J.B., Martins, L.F., Teixeira, L.A., Guimaraes, S.E.F., Guimaraes, J.D. (2013). Lack of relationship between testicular echotexture and breeding soundness evaluation in adult Nelore bulls. *Livestock Science* 154:246–249.
- Powis, R.I., Powis, W.J. (1984). *Thinker's guide to ultrasonic imaging*. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1984.
- Ragheb, D. a. H., J.L. (2002). Ultrasonography of the scrotum: Technique, anatomy, and pathologic entities. *Journal of Ultrasound in Medicine* 21, 171-185.
- Rantanen, N. W., and Ewing, R. L. (1981). Principles of ultrasound application in animals. *Veterinary Radiology* 22, 196-203.
- Rault P., G. O. (2006). Examen échographique génital du taureau. . *Le Point Vétérinaire* 272, 32-39.
- Rodríguez-Martínez, H. (2006). State of the in farm animal sperm evaluation. *Reproduction, Fertility and Development* 43, 1-11.
- Rodríguez-Martínez, H. (2007). State of the art in farm animal sperm evaluation. . *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 91–101.
- Rupp, G. P., L. Ball, M. C. Shoop, and P. J. Chenoweth. (1977). Reproductive efficiency of bulls in natural service: Effects of male to female ratio and single- vs multiple- sire breeding groups. *J Am Vet Med Assoc* 171, 639–642.
- Saacke, R.G., Nadir, S., Dalton, J. Assessing bull fertility. (1995) In: *Proceedings of the society of theriogenology*, vol. 1; 1995. p. 73.
- Sabés-Alsina, M., Johannisson, A., Lundeheim, N., Lopez-Bejar, M., Morrell, J.M. (2017). Effects of season on bull sperm quality in thawed samples in northern Spain. . *Vet Rec* 180, 251.

- Salisbury, G. W., N.I. VanDemark and J.R. Lodge (1978). Management Factors That Affect Reproductive Efficiency of the Bull. In: *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. In: *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, Salisbury, G.W., N.L. VanDemark and J.R. Lodge (Eds.) W.H. Freeman and Company, San Francisco, 733-789.
- Santos RL, S. C., Ribeiro AFC, Vasconcelos AC, Pesquero JL, Coelho SG, et al. (1999). Effect of growth hormone and induced IGF-I release on germ cell population and apoptosis in the bovine testis. *Theriogenology* 51, 957-984.
- Sellem, E., Broekhuijse, M.L.W.J., Chevrier, L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L. (2015). Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* 84, 1447-1454.
- SENASA (2019). Sistema de Registro de Centros de Inseminación y Transferencia Embrionaria (CIATE) del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
- Setchell, B. P. (1982). Spermatogenesis and spermatozoa. In: *Austin CR, Short RV, editors. Reproduction in mammalian. London: Elek.*, 63-101.
- Silva, A.E.D.F., Kastelic, J.P., Unanian, M.M., Freitas, A.R., Cook, R.B. (1997). Ultrasonografía de machos Nelore na fase peri-puberal. *Rev Bras Reprod Anim* 21, 34-36.
- Silverman, R. H. a. N., A.S. (1990). Image processing and pattern recognition in ultrasonograms by backpropagation. *Neural Networks* 3, 593-603.
- Singh, J., Pierson, R.A., Adams, G.P. (1997). Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. *J Reprod Fertil.* 1997;109:35–34.
- Singh, J., Pierson, R.A, Adams, G.P. (1998). Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles: endocrine and functional correlates. *J Reprod Fertil.* 1998;112:19–29.
- Singh, J., Adams, G.P. and Pierson, R.A. (2003). Promise of New Imaging Technologies for Assessing Ovarian Function. *Animal Reproduction Science* 78, 371-399.
- Sisson, S. a. G., J.D. (1973). Anatomía de los animales domésticos. *Salvat*.
- Soderquist, L, Janson, L., Larsson, K., Einarsson, S. Sperm morphology and fertility in AI bulls. *J Vet Med* 1991;38:534–43.
- Statistical Package for the Social Sciences; SPSS-15, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA.
- Staub, C. a. J., L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal* 12, 27-35.
- Terrabuio Andreussi, P.A, Sampaio Costa, D., Carvalho Faria, F.J., Carvalho Fernandes, C.A., Diniz Santos, M. and Correa Borges Silva, J. (2014). Testicular Histomorphometric Evaluation of Zebu Bull Breeds, *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.57 n.6: pp. 900-907.
- Thibier, M. C.-B., M.A.; Florin, B.; Baud, C. (1972). Le choix du jeune sur sa fonction taurillon sexuelle. *Elevage et Insemination* 127, 3-44.
- Tomlinson, M.; Jennings, A.; Macrae, A.; Truysers, I. (2017). The value of trans-scrotal ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. *Theriogenology* 89 (2017) 169–177
- Trenkle, A. R.L. (1977). Beef production efficiency: The efficiency of beef production can be improved by applying knowledge of nutrition and breeding. *Science* 198, 1009-1015.
- Tripathi, U. K., Chhillar, S., Kumaresan, A., Aslam, M.K.M., Rajak, S.K., Nayak, S., Manimaran, A., Mohanty T.K., Yadav, S. (2015). Morphometric evaluation of seminiferous tubule and proportionate numerical analysis of Sertoli and spermatogenic cells indicate differences between crossbred and purebred bulls. *Veterinary World* 8, 645-650.

- Urt, M.A.G., Bakarji, E.W.B., Faria, F.J.C., Santos, E.F. and Costa, D.S. (2018). Lack of Relationship between Testicular Echotexture and Seminal Characteristics in Adult Texel Rams. *Agricultural Sciences*, 9, 936-946. <https://doi.org/10.4236/as.2018.98065>
- Vincent, P., Underwood, S.L., Dolbec, C., Bouchard, N., Kroetsch, T., Blondin, P. (2014). Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. *Bovine Reproduction: John Wiley & Sons Inc.*, 685-695.
- Vogler, C.J., Saacke, R.G., Bame, J.M., Dejarnette, J.M., Mcgilliard, M.L., (1991). Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *J. Dairy Sci.* 74, 3827– 3835.
- Vlad, R. M., Czarnota, G.J., Giles, A., Sherar, M.D., Hunt, J.W., Kolios, M.C. (2005). High-frequency ultrasound for monitoring changes in liver tissue during preservation. . *Physics in Medicine & Biology* 50, 197-213.
- WHO (2011). *Manual of diagnostic ultrasound*. 1. -- 2nd ed / edited by Harald Lutz, Elisabetta Buscarini.
- Wilmington, J.A. (1981). Some investigations into the effect of sperm morphology on the fertility of semen used for artificial insemination. In: *Proceedings of the Association of Veterinary Teachers and Research Workers*, vol. 1; 1981. p. 1–11.)
- Wrobel, K. H. (2000). Prespermatogenesis and spermatogoniogenesis in the bovine testis. *Anat Embryol* 202, 209-222.

9. Anexo

Trabajos presentados en eventos científicos durante la Maestría

Conferencia Internacional de Fertilidad del toro, Westport, Irlanda

Echegaray, A.; Aventin, S.; Muñoz, I; Marcantonio, S.; Escartín, N. y Gnemmi, G. 2018. Relationship between the echotexture of testicular parenchima and the quality of spermatogenesis in bulls. International Bull Fertility Conference, 27-30 may 2018, Westport, Ireland.

Gnemmi, G.; Maraboli, C.; Escartín, N.; Muñoz, I; Marcantonio, S. y Echegaray, A. 2018. Interest in the study of the echotexture of testicular parenchima to evaluate the maturity of young bulls. International Bull Fertility Conference, 27-30 may 2018, Westport, Ireland.

22ª Conferencia Anual de la Sociedad Europea de Reproducción de Animales Domésticos, Córdoba, España.

Echegaray, A.; Marcantonio, S.; Maraboli, C.; Muñoz, I.; Escartín, N. y Gnemmi, G. 2018. New echotexture parameters to evaluate the testicular parenchima in bulls. Volume 53, Issue S2 Special Issue: Proceedings of the 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Cordoba, Spain, 27– 29 Sept. 2018 <https://doi.org/10.1111/rda.13272>

3er Simposio Internacional de Reproducción Animal del IRAC, Córdoba, Argentina

Marcantonio, S.; Echegaray, A.; Gnemmi, G.; Quiroga, H.; Capdevielle, E.F.; Alza, G.; Sara, R.C. y Miragaya, M. 2019. Relación entre ecotextura del parénquima testicular y resultados de la congelación seminal en toros. 13er Simposio Internacional de Reproducción Animal de IRAC, 28 al 30 de agosto de 2019, Córdoba, Argentina.

31 Congreso Mundial de Buiatría (WBC), Madrid, España.

Marcantonio, S.; Gnemmi, G.; Echegaray, A.; Quiroga, H. y Miragaya, M. 2020. Relationship between echotexture of the testicular parenchima and fresh and frozen-thawed semen quality in bulls. 31 World Buiatrics Congress, sept 27th to oct first 2020, Madrid, España (en evaluación).