

**INSEMINACION ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN VACAS PARA CARNE: EFECTO
DEL SITIO DE DEPOSICION DEL SEMEN Y DEL NUMERO DE ESPERMATOZOIDES
SOBRE EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO**

Gustavo Natalio Rosatti

Trabajo de Tesis para ser presentado como
requisito parcial para optar al Título de
MAGISTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Area de Posgrado de Producción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Estación Experimental Agropecuaria Balcarce
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Balcarce, Argentina

Abril de 2013

**INSEMINACION ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN VACAS PARA CARNE: EFECTO
DEL SITIO DE DEPOSICION DEL SEMEN Y DEL NUMERO DE
ESPERMATOZOIDES SOBRE EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO**

Gustavo Natalio Rosatti

.....
Director de Tesis: Juan F. Aller Atucha, Méd. Vet., MSc., Dr.

.....
Co-Director de Tesis: Santiago S. Callejas, Méd. Vet., MSc., Dr.

.....
Asesor: Ricardo H. Alberio, Méd. Vet., PhD.

.....
Asesor: Juan S. Vittone M.V., MSc.

INSEMINACION ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN VACAS PARA CARNE: EFECTO DEL SITIO DE DEPOSICION DEL SEMEN Y DEL NUMERO DE ESPERMATOZOIDES SOBRE EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO

Gustavo Natalio Rosatti

Aprobada por:

.....
Evaluadora: Andreína Cesari, Lic., Dr.

.....
Evaluador: Julian Bartolomé, Méd. Vet., PhD.

.....
Evaluador: Rodolfo Stahringer, Méd. Vet., PhD.

.

DEDICATORIA

A Marianela, por el apoyo incondicional que siempre me brindó.

A Alma, por fortalecer mi espíritu.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a Juan Aller por estar siempre, por su dedicación y amistad.

A Santiago Callejas por su apoyo y aportes.

A Adriana Cano, Gloria Monterubbianesi, Ricardo Alberio y Sebastian Vittone por su colaboración.

A todas las personas que colaboraron en la realización de los experimentos (personal de las EEA Balcarce, Concepción del Uruguay y Reconquista).

A Andreína Cesari, Julian Bartolomé y Rodolfo Stahringer por sus aportes.

A Marita por su ayuda incondicional.

A los amigos y compañeros de posgrado por los excelentes momentos compartidos.

INDICE

Indices de cuadros	ix
Indices de figuras	x
Listado de abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
1.1. Hipótesis	4
1.2. Objetivos	5
2. Revisión bibliográfica	6
2.1. Generalidades del ciclo estral de la hembra bovina	6
2.2. Dinámica folicular en hembra no gestante	7
2.3. Ovulación	8
2.4. Interacción funcional entre los espermatozoides y el tracto reproductor femenino	10
2.4.1. Transporte del espermatozoide en el tracto genital femenino	11
2.4.2. El oviducto y el transporte de los espermatozoides al sitio de fertilización	11
2.4.3. Capacitación espermática	13
2.5. Fecundación	14
2.6. Inseminación artificial	15
2.6.1. Sucesos históricos relevantes	15
2.6.2. Inseminación artificial a tiempo fijo	16
2.6.3. Factores que afectan la tasa de gestación en un programa de IATF	17
2.6.3.1. Aspectos relacionados con la calidad del semen criopreservado y con el número de espermatozoides por dosis	17
2.6.3.2. Aspectos relacionados con la hembra	19
2.6.3.3. Aspectos relacionados con la aplicación de la técnica	20
2.6.3.3.1. Tratamientos de sincronización de celo/ovulación	20
2.6.3.3.2. Lugar de deposición del semen	21
2.6.3.3.3. Momento de la IATF	22

2.6.3.3.4. Inseminador	23
2.7. Factores que afectan el sexo de la cría	24
3. Materiales y métodos	26
3.1. Experimento 1: “Vacas sin cría”	26
3.1.1. Animales y lugar experimental	26
3.1.2. Tratamiento hormonal y semen utilizado	26
3.1.3. Estudios ecográficos	27
3.1.4. Diseño experimental	27
3.1.5. Análisis estadísticos	28
3.2. Experimento 2: “Vacas con cría”	30
3.2.1. Animales y lugares experimentales	30
3.2.2. Tratamiento hormonal y semen utilizado	30
3.2.3. Estudios ecográficos	31
3.2.4. Diseño experimental	31
3.2.5. Análisis estadísticos	33
4. Resultados	35
4.1. Experimento 1: “Vacas sin cría”	35
4.1.1. Condición corporal	35
4.1.2. Diámetro del folículo dominante y proporción de animales que ovularon según el momento de ovulación	35
4.1.3. Tasa de gestación según el tratamiento	36
4.1.4. Tasa de gestación según el diámetro del FD al proestro y el momento de ovulación	37
4.1.5. Proporción del sexo de las crías	37
4.2. Experimento 2: “Vacas con cría”	39
4.2.1. Condición corporal e intervalo parto-tratamiento	39
4.2.2. Diámetro del folículo dominante y proporción de animales que ovularon según el momento de ovulación	39
4.2.3. Tasa de gestación según el tratamiento	40
4.2.4. Tasa de gestación según el diámetro del FD al proestro y el momento de ovulación	41
4.2.5. Proporción del sexo de las crías	41
5. Discusión	43
6. Conclusión	51
7. Implicancias	52

8. Bibliografía	53
9. Publicación surgida de la presente tesis	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condición corporal (CC) al inicio del experimento en “vacas sin cría” que ovularon	35
Cuadro 2. Diámetro del folículo dominante (FD; mm) a las 24 hs de retirado el DIB y proporción (%) de animales que ovularon según el momento de ovulación en “vacas sin cría”	36
Cuadro 3. Proporción de terneros macho según el ovario donde ocurrió la ovulación en “vacas sin cría”	38
Cuadro 4. Proporción de terneros macho según el momento de ovulación (MOV) respecto de la IATF en “vacas sin cría”	38
Cuadro 5. Condición corporal (CC) e intervalo parto-tratamiento hormonal (IPT) al inicio del experimento en “vacas con cría” que ovularon	39
Cuadro 6. Diámetro del folículo dominante (FD; mm) a las 24 hs de retirado el DIB y proporción de animales que ovularon (%) según el momento de ovulación en “vacas con cría”	40
Cuadro 7. Proporción de terneros macho según el ovario donde ocurrió la ovulación en “vacas con cría”	42
Cuadro 8. Proporción de terneros macho según el momento de ovulación (MOV) respecto de la IATF en “vacas con cría”	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Presentación esquemática del tratamiento hormonal, de las IATFs y de las observaciones ecográficas realizadas en “vacas sin cría”	28
Figura 2.	Presentación esquemática del tratamiento hormonal, de las IATFs y de las observaciones ecográficas realizadas en “vacas con cría”	32
Figura 3.	Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) para los diferentes tratamientos en “vacas sin cría”	36
Figura 4.	Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) según el momento de ovulación en “vacas sin cría”	37
Figura 5.	Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) para los diferentes tratamientos en “vacas con cría”	40
Figura 6.	Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) según el diámetro del folículo dominante (FD) medido a las 24 hs de retirado el DIB y el momento de ovulación (MOV) en “vacas con cría”	41

LISTADO DE ABREVIATURAS

AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
BE:	Benzoato de estradiol
CC:	Condición corporal
CL:	Cuerpo lúteo
DC:	Detección de celo
DCE:	Dosis convencional de espermatozoides
DRE:	Dosis reducida de espermatozoides
eCG:	Gonadotropina coriónica equina
EEA:	Estación experimental agropecuaria
FD:	Folículo de mayor tamaño presuntamente dominante
FSH:	Hormona folículo estimulante
GnRH:	Factos liberador de gonadotropina
hCG:	Gonadotropina coriónica humana
IA:	Inseminación artificial
IATF:	Inseminación artificial a tiempo fijo
IGF:	Factor de crecimiento similar a la insulina
IPT:	Intervalo entre partos
LH:	Hormona luteinizante
MOV:	Momento de ovulación
PG:	Prostaglandina
PGF2 α :	Prostaglandina F2 α
PROC:	Procedimiento
RE:	Reservorio espermático
T:	Tratamiento
TG:	Tasa de gestación
UUT:	Unión útero-tubárica
X ² :	Chi-cuadrado

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue determinar el efecto del lugar de deposición del semen combinado con una dosis reducida de espermatozoides (DRE) y el número de veces que se realiza la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) sobre la tasa de gestación (TG). Dos objetivos secundarios fueron: i) evaluar el efecto del ovario [izquierdo (OI) o derecho (OD)] donde ocurre la ovulación e ii) el momento de la ovulación respecto del momento de la IATF sobre la proporción de terneros macho/total de las crías (M/TC). Se realizaron 2 experimentos. Exp1: 59 vacas Angus sin cría y Exp2: 177 vacas Hereford y Braford con cría. Las vacas fueron tratadas con un dispositivo intravaginal con progesterona durante 7 (Exp1) u 8 días (Exp2) para sincronizar e inducir la ovulación. Se realizó ecografía ovárica a las 24 hs de retirado el dispositivo para determinar el ovario con folículo dominante (FD) y a la IATF para determinar la ausencia (ovulación pre-IATF) o presencia del FD. Se utilizó semen de tres toros. De un eyaculado de cada toro se procesaron (congelación) pajuelas con DRE (Exp1: $DRE=8 \times 10^6$ y Exp2: $DRE=5 \times 10^6$ totales) y con dosis convencional de espermatozoides (DCE; Exp1: $DCE=40 \times 10^6$ y Exp2: $DCE=25 \times 10^6$ totales). Las vacas fueron distribuidas en cuatro tratamientos (T); T1 (control): IA en cuerpo del útero con DCE, T2: IA en cuerpo del útero con DRE, T3: IA en cuerno uterino ipsilateral (CIL) al FD con DRE y T4: doble IA en CIL al FD con DRE. La IATF se realizó a las 54-56 hs de retirado el dispositivo y la segunda IATF del T4 se realizó a las 72 hs. Por medio de ecografía, la ovulación (pre y pos IATF) fue confirmada 10 días después de la IATF por presencia del cuerpo lúteo. El diagnóstico de gestación se realizó a los 35 días después de la IATF. En Exp1, la TG [T1=46,2% (6/13), T2=52,9% (9/17), T3=64,3% (9/14), T4=73,3% (11/15)] fue similar ($P>0,10$) entre tratamientos. En Exp2, la TG [T1=38,3% (18/47), T2=28,9% (13/45), T3=58,1% (25/43), T4=42,9% (18/42)] del T3 fue mayor ($P<0,05$) que la del T1 y T2, mientras que la TG del T4 fue similar a la de los demás tratamientos. La proporción M/TC no fue afectada ($P>0,10$) por el ovario donde ocurrió la ovulación [Exp1: OI=54,5% (6/11), OD=36,8% (7/19); Exp2: OI=43,5% (10/23), OD=51,2% (22/43)]. En Exp1, la proporción M/TC en vacas que ovularon antes de la IATF [40% (2/5)] fue similar ($P>0,10$) a la obtenida en vacas que ovularon después [43,8% (7/16)], sin embargo en el Exp2 tendió a ser diferente ($P=0,07$) [16,7% (1/6) y 63% (17/27) respectivamente]. Se concluyó que: a) una IATF combinada con una DRE depositados en CIL al FD aumenta la TG, b) dos IATF con DRE en CIL al FD no mejora la TG respecto a la obtenida con una IATF convencional y c) la proporción

M/TC podría ser mayor en vacas que ovulan después comparada con vacas que ovulan antes de la IATF.

Palabras clave: bovino, inseminación intracornual, proporción de sexos.

ABSTRACT

Fixed-time artificial insemination in beef cattle: effect of semen deposition site and sperm number on reproductive performance.

The main objective of the present study was to determine the effect of semen deposition site combined with low dose spermatozoa (LDS) and of single and double timed artificial insemination (TAI) on the pregnancy rate (PR). Additional aims of the present study were to evaluate the effect of the side of ovary [right (RO) or left (LO)] where ovulation occurred and the time of ovulation in relation to the time of insemination on the ratio calved male/total offspring (M/O). Two experiments (Exp) were carried out. Exp 1: 59 non-lactating Angus cows and Exp 2: 177 Hereford and Braford suckling cows. In both experiments the cows were treated with a progesterone-intravaginal device during 7 (Exp1) or 8 days (Exp2) to induce ovulation and were TAI. Ovarian ultrasonography was performed to identify the presumptive dominant follicle (DF) 24 h after device removal and at the time of TAI to confirm the absence (ovulation prior TAI) or presence of the DF. Ovulation was defined as the disappearance of DF at TAI. Semen of three bulls was used. One ejaculate from each bull was split into two sperm concentrations [LDS=8 (Exp1) or 5 (Exp2)] and conventional dose spermatozoa (CDS) [CDS= 40 (Exp1) or 25 (Exp2) million spermatozoa]. Straws were then frozen in a programmable freezing machine. Animals were assigned to four treatments (T); T1 (control): AI into the uterine body with CDS, T2: AI into the uterine body with LDS, T3: AI into the ipsilateral uterine horn (IUH) to the ovary bearing the DF with LDS and T4: two AI into the IUH to the ovary bearing the DF with LDS. Cows were TAI 54-56 h after device removal. The second TAI of the T4 was performed 72 h after device removal. Ovulation (before or after TAI) and pregnancy were confirmed by ultrasonography 10 and 35 days after TAI, respectively. In Exp1, the PR [T1=46.2% (6/13), T2=52.9% (9/17), T3=64.3% (9/14), T4=73.3% (11/15)] was similar ($P>0.10$) among treatments. In Exp2, the PR [T1=38.3% (18/47), T2=28.9% (13/45), T3=58.1% (25/43), T4=42.9% (18/42)] of T3 was greater ($P<0.05$) than those of T1 and T2, while PR of T4 was similar to the rest of treatments. Ratio M/O was not affected ($P>0.10$) by the ovary where ovulation occurred [Exp1: LO=54.5% (6/11), RO=36.8% (7/19); Exp2: LO=43.5% (10/23), RO=51.2% (22/43)]. In Exp1, the ratio M/O in cows ovulating before TAI [40% (2/5)] was similar ($P>0.10$) to that obtained in ovulating cows after [43.8% (7/16)], however in Exp2 the ratio M/O tended to be different ($P=0.07$) [16.7%

(1/6) y 63% (17/27) respectively]. It is concluded that: a) a single TAI into the IUH to the ovary bearing the DF combined with LDS increase the PR, b) double TAI into the IUH to the ovary bearing the DF combined with LDS does not increase the PR respect to that obtained with conventional TAI and c) the ratio M/O could be higher in cows that ovulating after compared to with cows that ovulating before TAI.

Key words: bovine, intracornual insemination, sex ratio.

1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una biotecnología que ha demostrado una gran utilidad en los programas de mejoramiento genético. En los primeros cuarenta años la IA realizada con semen congelado ha estado basada en la detección visual de celos (DC) y la adopción por los productores de leche hizo que sea la tecnología más importante del siglo pasado. Sin embargo, en los sistemas de cría, la DC constituye un problema, ya que demanda largos períodos de tiempo debido a la dispersión natural de los eventos reproductivos. El interés por resolver este problema llevó, por un lado, al desarrollo de técnicas para sincronizar los celos y así acortar el tiempo utilizado para su detección y por otro, para inducir ovulaciones sincronizadas, especialmente dirigidas a contrarrestar los efectos negativos del anestro posparto. La combinación estradiol/progesterona o sus análogos son capaces de inducir el celo y la ovulación en vacas de cría que no presentan cuerpo lúteo (Alberio *et al.*, 1986; Mapletoft *et al.*, 1999; Yavas; Walton, 2000). De manera que, un tratamiento de sincronización e inducción de celo y ovulación presenta el potencial para que la IA sea realizada en un tiempo fijo (IATF) y consecuentemente permite reducir el período de partos e incrementar la uniformidad de los terneros. Por lo tanto, la IATF actualmente es la herramienta más difundida de las biotecnologías reproductivas en el ganado para carne. En Argentina, hay aproximadamente 20 millones de vacas para carne y en 2011 se comercializaron casi 2 millones de dosis de semen congelado de toros para carne (CABIA, 2013). Por lo que se estima que, sólo un 10 % del total de hembras para carne fueron inseminadas y probablemente la mayoría de las inseminaciones se realizaron a tiempo fijo.

Numerosos trabajos están dirigidos a aumentar la eficiencia de la IATF. Una forma de lograrla sería a través de la disminución del número de espermatozoides por dosis permitiendo multiplicar la cantidad de vacas a inseminar con un eyaculado proveniente de toros de alto valor genético. Pero, para ello, deben considerarse algunas modificaciones en el procedimiento de la IA propiamente dicha.

Varios estudios han demostrado que la deposición del semen cercana a la unión útero-tubárica en el cuerno ipsilateral al ovario con folículo preovulatorio combinada con un bajo número de espermatozoides, puede ser una alternativa para obtener una mayor (Verberckmoes *et al.*, 2004; Verberckmoes *et al.*, 2005) o similar (Kurykin *et al.*, 2003) tasa de gestación que la obtenida con un número convencional de

espermatozoides (15 a 30 millones) depositados en el cuerpo uterino. Sin embargo, la deposición profunda de semen combinada con una dosis reducida de espermatozoides no fue evaluada cuando se utiliza progestágeno y estrógeno para la sincronización e inducción del estro y la ovulación. La deposición profunda de semen disminuye la pérdida espermática como consecuencia del flujo retrógrado hacia la vagina y la fagocitosis durante la migración por el útero. Además, evita las barreras naturales a las que se exponen los espermatozoides en el proceso de la inseminación y mejora la capacidad fertilizante (Hunter, 2003). Por otro lado, se ha observado que el eyaculado es una población heterogénea de células espermáticas porque difieren en edad después de la espermiación y probablemente en el grado de maduración. Dicha población disminuye al ser sometida a un proceso de congelación y descongelación (Bailey *et al.*, 2000). Los espermatozoides que sobreviven a estos procesos, sufren cambios en la membrana plasmática que aumentan la tasa de capacitación que conduce inexorablemente a la muerte, lo cual explicaría la disminución de la vida media comparada con la de los espermatozoides no congelados. Esto es particularmente importante porque con el uso de tratamientos hormonales para la IATF, el tiempo promedio desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación es de 65 hs -rango=36 a 108 hs- (Avilés *et al.*, 2005; Pincinato *et al.*, 2005; Vittone *et al.*, 2011) y varía con el tratamiento utilizado. De manera que, al realizar la IATF con semen congelado, la vida media de los espermatozoides estaría reducida y, ante un rango muy amplio de ovulaciones (más de 30-40 hs), la fertilidad del tratamiento podría estar comprometida.

Por lo tanto, en este trabajo, se propone estudiar el efecto de reducir el número de espermatozoides que se utiliza tradicionalmente en una IATF sobre la tasa de gestación y además, se plantea analizar cómo influye el lugar de deposición del semen y el número de veces que se realiza la IATF, cuando se utiliza una dosis reducida de espermatozoides después de realizar un tratamiento de sincronización e inducción del estro y la ovulación basado en la utilización de un progestágeno y estrógeno.

Por otro lado, algunos trabajos en bovino demostraron que la proporción del sexo de las crías podría ser afectada por factores maternos. Se demostró que en el cuerno uterino derecho fueron gestados más terneros macho que en el cuerno uterino izquierdo en vacas que recibieron servicio con toro y que probablemente se debió al ovario que dio origen al ovocito (Hylan *et al.*, 2009). De manera que, la proporción de crías de sexo masculino podría ser mayor en vacas que ovulan en el ovario derecho.

Además, otros estudios en bovinos demostraron que el momento de la IA respecto de la ovulación puede ser utilizado para alterar la relación macho:hembra esperada (Pursley *et al.*, 1998). Por otro lado, se sugirió que los espermatozoides con cromosoma Y se podrían capacitar antes que los espermatozoides X, y por lo tanto, su capacidad fertilizante podría estar disminuida cuando la ovulación se produce varias horas después de la IATF (Wehner *et al.*, 1997). En consecuencia, se podría hipotetizar que las vacas que ovulan previamente al momento de la IATF tendrían una mayor proporción de crías de sexo masculino que las vacas que ovulan tardíamente.

Por último, en este trabajo, se pretende estudiar el efecto del ovario donde ocurre la ovulación y el momento de la IATF sobre la proporción del sexo de las crías.

1.1. Hipótesis

- La IATF, realizada a las 56 hs de retirado el dispositivo con un número reducido de espermatozoides (5-8 millones) y depositados en el cuerno ipsilateral al ovario con folículo dominante, produce una tasa de gestación similar a la obtenida con una IATF convencional realizada con 25-40 millones de espermatozoides depositados en el cuerpo del útero.
- La doble IATF (56 y 72 hs de retirado el dispositivo), realizada con un número reducido de espermatozoides (5-8 millones) y depositados en el cuerno ipsilateral al ovario con folículo dominante, mejora las tasas de gestación obtenidas con una IATF convencional o con una sola IATF profunda con dosis reducida.
- Las vacas cuando ovulan en el ovario derecho presentan una mayor proporción de terneros macho que cuando ovulan en el ovario izquierdo.
- Las vacas cuando ovulan previo al momento de la IATF realizada a las 56 hs, presentan una mayor proporción de terneros macho que cuando ovulan posteriormente.

1.2. Objetivos

Objetivo general

Mejorar la eficiencia biológica de la IATF.

Objetivos específicos

- a) Determinar el efecto de reducir el número de espermatozoides que se utiliza comercialmente (tradicional) en un programa para IATF en vacas para carne sobre la tasa de gestación.
- b) Evaluar si la tasa de gestación obtenida después de una IATF con un número reducido de espermatozoides se ve afectada por el lugar de deposición del semen.
- c) Determinar si dos IATFs con dosis reducida de espermatozoides y depositados en el cuerno ipsilateral al folículo dominante, producen una mayor tasa de gestación que una sola IATF.
- d) Comparar la proporción de terneros macho sobre el total de las crías entre las vacas que ovulan en el ovario izquierdo o derecho y antes o después de la IATF realizada a las 56 hs.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del ciclo estral en la hembra bovina

La hembra bovina es una especie poliéstrica anual porque presenta varios ciclos estrales al año en condiciones normales de alimentación y salud. El ciclo estral es el período comprendido entre dos estros consecutivos y se caracteriza por cambios morfológicos, fisiológicos y de comportamiento (Hafez; Hafez, 2000a).

Después de la pubertad, el ciclo estral normal del bovino tiene una duración promedio de 21 días con una variación entre 17 y 24 días. El estro tiene una duración media de 18 hs . Desde el inicio del estro hasta la ovulación transcurren entre 24 y 30 hs. La ovulación ocurre aproximadamente 12 hs después de finalizado el estro (Allrich, 1994).

El ciclo estral del bovino se puede dividir en dos fases: 1) la fase folicular, que se caracteriza por el crecimiento final del folículo preovulatorio. Comienza con la lutéolisis y finaliza con la ovulación, tiene una duración de 3 a 4 días y 2) la fase lútea, se desarrolla el cuerpo lúteo (CL). Se inicia después de la ovulación y presenta una duración de 17 días aproximadamente. La regulación hormonal del ciclo estral está controlada por el eje hipotálamo, hipófisis, ovarios y útero (Hafez; Hafez, 2000a).

Antes del comienzo del estro, el folículo dominante aumenta el número de receptores de hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa y aumenta el tamaño, lo que resulta en un incremento en la concentración de estradiol en el folículo. El estradiol circulante alcanza una concentración y duración suficiente para inducir el comportamiento estral y el pico preovulatorio del factor liberador de gonadotropina (GnRH) y de la LH. Posteriormente se produce la ovulación y luego comienza la fase lútea mediante el proceso de luteinización de las células foliculares presentes en el ovario. Hay un aumento progresivo en la concentración de progesterona circulante hasta un máximo en el día 9-12 del ciclo, conforme crece el CL. Luego se mantiene elevada durante la vida del CL, lo cual es esencial para el desarrollo, mantenimiento y establecimiento del embrión, en caso de gestación. Además, la progesterona bloquea el pico preovulatorio de LH y la ovulación (Christensen *et al.*, 1974; Kesner *et al.*, 1981; Walters; Schallenberger, 1984). En caso que no se produzca la implantación del embrión, se produce la lutéolisis, es decir la regresión del cuerpo lúteo para que se

inicie un nuevo ciclo estral (Zheng *et al.*, 1994). El principal agente luteolítico es la prostaglandina F₂α de origen uterino (Niswender *et al.*, 1994).

2.2. Dinámica folicular en hembra no gestante

Los folículos primordiales forman la reserva ovocitaria que la hembra va utilizar durante toda su vida reproductiva. En el ovario de una hembra bovina al nacimiento, se encuentra un promedio de 133.000 folículos primordiales e histológicamente se caracterizan por el ovocito detenido en la profase de la primera división meiótica (diplotene) rodeado de una capa plana de células escamosas de la pre-granulosa (Erickson, 1966).

El desarrollo folicular es un proceso dinámico, caracterizado por una marcada proliferación y una diferenciación de células foliculares, que genera un ambiente óptimo para la maduración del ovocito y para su fertilización después de la ovulación (Armstrong; Webb, 1997).

En los rumiantes monovulatorios, como el bovino, una vez iniciado el crecimiento del folículo primordial continúa hasta que el folículo se convierte en ovulatorio o atrésico antes de la ovulación. Durante la primera etapa, de folículo pre-antral, la activación y el posterior crecimiento del folículo primordial dependen de la interacción entre las células de la pre-granulosa, el ovocito y la secreción de una serie de factores locales (Webb *et al.*, 2004). Mientras que, el crecimiento del folículo antral dependerá de las gonadotrofinas (Eppig, 2001).

El crecimiento de los folículos se produce en dos o tres ondas en cada ciclo estral (Knopf *et al.*, 1989). Cada onda folicular presenta tres fases denominadas: de reclutamiento, de selección y de dominancia (Ginther, 2000).

Durante la fase de reclutamiento, un grupo de folículos antrales de 4 mm de diámetro con capacidad para responder a las gonadotrofinas, crecen durante 2 ó 3 días (Ginther *et al.*, 1997). En la fase de selección, uno de los folículos reclutados es seleccionado para continuar su crecimiento y convertirse, en la fase de dominancia, en folículo dominante, quien promueve la disminución de la tasa de crecimiento y finalmente la atresia del resto de los folículos (folículos subordinados) e inhibe el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos (Ginther, 2000).

Cada onda de crecimiento folicular está precedida por un aumento transitorio en la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH). De modo que, esta hormona

sería uno de los factores responsables del reclutamiento de los folículos antrales (Adams *et al.*, 1992).

Luego de la emergencia de la onda folicular, los folículos comienzan a deprimir la concentración de FSH mediante la retroalimentación negativa ejercida por el estradiol y la inhibina sobre el hipotálamo y la hipófisis (Adams *et al.*, 1992). Antes de la selección folicular, la FSH alcanza la concentración más baja (Ginther *et al.*, 1997) la que es inadecuada para sostener el crecimiento de los folículos subordinados y por lo tanto estos sufren atresia. Mientras que, el folículo dominante presenta la capacidad de seguir creciendo con bajo niveles de FSH (Ginther, 2000). Se ha determinado que las células de la granulosa del folículo dominante expresan receptores para LH y que los sucesos de desviación del tamaño y aumento de LH ocurren simultáneamente (Ginther *et al.*, 2003). Esto podría explicar que el folículo dominante continúa creciendo con bajos niveles de FSH.

Además, el incremento del estradiol intrafolicular se debe en parte al aumento de la biodisponibilidad del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1). El estradiol es mayor en el folículo dominante que en los folículos subordinados porque presenta una menor actividad de las proteínas fijadoras de IGF (Savio *et al.*, 1993).

La culminación del crecimiento del folículo dominante tendría dos destinos posibles: la atresia o la ovulación, que depende de la concentración circulante de progesterona, es decir de la presencia o no del CL.

2.3. Ovulación

La ovulación es un proceso por el cual el ovocito se libera del folículo de Graff. En las especies con un crecimiento folicular en ondas, como los bovinos, la ovulación es espontánea.

Al final del ciclo estral, el estrógeno sérico aumenta y estimula principalmente el hipotálamo quien libera GnRH. Este actúa sobre la hipófisis y se produce un aumento de la concentración en sangre de LH que conduce a la ovulación. El intervalo entre el pico de LH y la ovulación es de 27 hs (Larsson, 1987; Saumande; Humblot, 2004).

La unión de la LH a su receptor en la célula de la granulosa del folículo preovulatorio desencadena varias señales intracelulares que dan comienzo al proceso de la ovulación (Duggavathi; Murphy, 2009).

La ovulación no es un fenómeno explosivo (Baker, 1982), sino que es un proceso que involucra una secuencia de eventos que conducen a la expansión del *cumulus oophorus*, la reanudación meiótica del ovocito y la ruptura del folículo (Edson *et al.*, 2009).

Una característica de las células de la granulosa es la formación de redes comunicantes (Merk *et al.*, 1973) que unen a las células entre sí, y están en contacto con la membrana plasmática del ovocito y las células de la teca (Buccione *et al.*, 1990) que en conjunto forman un sincitio funcional.

La LH induce la expresión de los receptores de progesterona en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. Al inicio de la ovulación, la síntesis de estrógeno es relativamente alta y la de progesterona es insignificante. Más tarde la relación de síntesis de estrógeno/progesterona se invierte. Se determinó que la síntesis de progesterona desempeña un rol de importancia en el proceso de la ovulación y de la luteinización antes de la ruptura del folículo (Espey, 1994).

La interacción de la progesterona local (sintetizada por las células de la teca) con sus receptores, antes del pico de LH (Edson *et al.*, 2009) induce la aparición de factores autócrinos y parácrinos como el factor de crecimiento epidérmico (Conti *et al.*, 2006) y la ciclooxygenasa 2 (Sirois *et al.*, 2004) que intervendrían en la reducción de las uniones entre las células de la granulosa. En consecuencia, hay una expansión de las células del *cumulus oophorus* (Jiménez *et al.*, 2010).

Además, para la expansión del *cumulus oophorus* se requiere la producción de ácido hialurónico que forma el esqueleto estructural de la matriz del *cumulus*. Las cadenas del ácido hialurónico se estabilizan mediante la interacción con proteínas adicionales de la matriz lo que ejerce una atracción del agua. En consecuencia, se produce una separación entre las células del *cumulus oophorus* y éstas con el ovocito (Edson *et al.*, 2009).

Mediante la expansión de *cumulus oophorus*, el ovocito es liberado de las conexiones celulares y continúa la meiosis (Wert; Larsen, 1990).

La ruptura de la pared del folículo se pensaba que era una consecuencia de un aumento en la presión hidrostática en el antro folicular. Sin embargo, la presión intrafolicular (15-20 mm Hg) no varía durante el proceso ovulatorio. Más tarde, se informó que la ruptura del folículo depende de la remodelación del tejido que rodea la pared del folículo y el proceso es semejante a una reacción inflamatoria debido a los cambios celulares y vasculares (Espey, 1994). Una serie de enzimas proteolíticas, entre ellas la colagenasa, son sintetizadas a partir de la señal de la LH (Edson *et al.*,

2009) e intervienen en la remodelación de las proteínas estructurales que componen la pared folicular (Irving-Rodgers *et al.*, 2006). Mediante este mecanismo, una pequeña área en la pared del folículo preovulatorio se vuelve más fina y transparente a la que se denomina estigma. Antes de la salida del contenido folicular, el estigma protruye como una ampolla en la superficie del ovario. Luego la ampolla se abre y en un principio sale a borbotones líquido folicular acuoso. Esto es seguido por una ligera secreción de un material más viscoso que contiene el ovocito II (ovocito en la metafase de la segunda división meiótica) y algunas células de la granulosa (Baker, 1982).

2.4. Interacción funcional entre los espermatozoides y el tracto reproductor femenino

Los espermatozoides mediante el transporte del genoma haploide, cumplen con la única función de alcanzar la singamia junto con el ovocito (Holt *et al.*, 2006). Por otro lado, el tracto reproductor femenino representa barreras anatómicas y fisiológicas como mecanismos de selección de los espermatozoides.

El transporte espermático es un fenómeno de migración de los espermatozoides desde el sitio de deposición del semen hasta la ampolla del oviducto y se debe a la acción del tracto reproductor femenino y al movimiento flagelar de los espermatozoides. El transporte espermático puede ser medido cuantitativamente mediante el recuento de espermatozoides accesorios incorporados o fijados a la zona pelúcida del ovocito (Hawk, 1983).

Las contracciones del músculo liso, el movimiento rítmico de las cilias y los flujos de líquido en el tracto reproductor femenino y la actividad flagelar del espermatozoide son los mecanismos primarios del transporte espermático (Battalia; Yanagimachi, 1979; Gaddum-Rose, 1981).

En el ganado vacuno, el semen es depositado por el toro en el extremo anterior de la vagina contra el cuello del útero y luego, para lograr la fertilización del ovocito, suceden tres etapas: 1) el transporte espermático cérvico-uterino inmediatamente después de la deposición seminal, 2) la colonización del reservorio espermático [RE; unión útero-tubárica (UUT) e istmo caudal del oviducto] y 3) la liberación lenta del RE y transporte de espermatozoides hacia la ampolla del oviducto.

2.4.1. Transporte del espermatozoide en el tracto genital femenino

Luego de la deposición en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides son transportados a la UUT en dos fases (Vandemark; Moeller, 1951): 1) fase rápida: inicialmente una pequeña subpoblación de espermatozoides es transportada en un corto período de tiempo (en unos pocos minutos). Por otro lado, Overstreet y Cooper (1978) determinaron que los espermatozoides de conejos transportados rápidamente no fueron importantes para la fertilización, porque la mayoría de los encontrados en la ampolla y la fimbria eran inmóviles y tenían las membranas plasmáticas dañadas. 2) fase lenta: esta fase se caracteriza por un transporte espermático más lento a través del útero, mediante el cual se incrementa gradualmente el número de espermatozoides en la UUT a lo largo de varias horas.

El cérvix es la primera barrera que afrontan los espermatozoides en el tracto reproductor femenino. El canal endocervical, además de pliegues, hendiduras y surcos, tiene en su interior un fluido mucoso que los espermatozoides deben atravesar de forma activa (Mattner, 1963). No obstante, durante el estro bajo la influencia del estrógeno, el moco cervical es menos viscoso y las moléculas de mucopolisacáridos adquieren una disposición laminar. Asimismo, las contracciones del músculo liso se vuelven más frecuentes, fuertes y se propagan longitudinalmente a lo largo del cuerno uterino (Crocker; Shelton, 1973; Hawk, 1975).

Se ha sugerido, sobre la base del número de espermatozoides y la motilidad en el tracto reproductor femenino, que el cuello del útero sirve como reservorio de espermatozoides (Mattner, 1963, 1966), pero gran parte de los espermatozoides se pierden durante su recorrido desde la vagina hasta el oviducto (Hunter, 2003) y a través del pasaje retrógrado desde la vagina al exterior (Dobrowolski; Hafez, 1970).

2.4.2. El oviducto y el transporte de los espermatozoides al sitio de fertilización

El oviducto es un órgano de importancia crucial en la modulación de la función espermática y puede ser uno de los sitios más importantes en la selección de los espermatozoides. Según un estudio realizado en cerdas, Georgiou *et al.* (2007) concluyeron que existiría un mecanismo de reconocimiento de espermatozoides en el oviducto responsable de la selección, supervivencia y motilidad de los mismos. En la hembra bovina, como en otras especies, en la que hay un retraso de la ovulación

respecto al inicio del estro, la UUT y el istmo caudal del oviducto funcionan como un sitio de almacenamiento de espermatozoides durante el período preovulatorio (Hunter; Wilmut, 1984).

La migración del espermatozoide por la luz estrecha de la UUT depende de la interacción específica entre la superficie epitelial y los espermatozoides (Yamaguchi *et al.*, 2009). En un estudio realizado en cerdos, Fazeli *et al.* (1999) concluyeron que la capacitación espermática reduce la capacidad de los espermatozoides de unirse a las células epiteliales oviductales. Asimismo, en un estudio realizado en conejos, Bedford y Shalkovsky (1967) concluyeron que las etapas finales de la capacitación espermática ocurren en el oviducto. En otro estudio realizado en cerdas, se sugirió que el bicarbonato presente en el líquido oviductal podría ser la molécula que inicia la capacitación espermática (Rodríguez-Martínez, 2007). Estos trabajos sugieren que el espermatozoide capacitado tendría dificultad para ingresar al oviducto, por lo tanto habría una selección espermática por parte de la membrana de las células epiteliales de la UUT.

El istmo caudal presenta una luz estrecha y un alto contenido de mucus que frena el progreso de los espermatozoides hacia el lugar donde se produce la fertilización, la ampolla. Además, los espermatozoides quedan unidos al epitelio oviductal mediante carbohidratos, glicoproteína y glicolípidos por un período de tiempo hasta que ocurre la ovulación (Suarez, 1998). Cuando se produce la ovulación, algunos espermatozoides adquieren una alta motilidad (hipermotilidad espermática) y se dirigen a la ampolla del oviducto en cuestión de minutos (Hunter; Nichol, 1983).

Los productos de la ovulación (líquido folicular y complejo *cumulus oophorus*) tendrían un efecto sobre el transporte espermático en el oviducto (Ito *et al.*, 1991). En un estudio realizado en mujeres, las cuales fueron inseminadas artificialmente, encontraron mayor cantidad de espermatozoides en la ampolla ipsilateral al ovario donde ocurrió la ovulación (Williams *et al.*, 1993). El mecanismo por el cual los espermatozoides se movilizarían desde el istmo caudal al ovocito podría ser la quimiotaxis (movimiento espermático en favor de un gradiente químico) (Giojalas; Rovasio, 1998; Fabro *et al.*, 2002). Sin embargo, en el bovino, es poco probable que esto ocurra, porque la distancia entre el istmo caudal y la ampolla es relativamente larga. Este fenómeno ocurriría en la vecindad de la gameta femenina (en la zona ampular del oviducto), mientras que el transporte entre el istmo caudal (lugar donde se almacenan los espermatozoides) y el sitio de fertilización podría estar mediado por la termotaxis (movimiento espermático en favor de un gradiente térmico). En algunas

especies se demostró que la temperatura de la ampolla es mayor a la del istmo y que la diferencia es más acentuada después de la ovulación (Bahat *et al.*, 2003).

El papel de la quimiotaxis no es dirigir muchos espermatozoides hacia el óvulo, sino una subpoblación selecta de espermatozoides, es decir espermatozoides capacitados, y ocurriría en las inmediaciones y dentro del complejo *cumulus oophorus* (Eisenbach, 1999).

La interacción del espermatozoide y el oviducto parece ser un mecanismo de selección específico que tiene la función de prevenir que el ovocito sea fecundado por un espermatozoide de calidad inferior.

2.4.3. Capacitación espermática

En mamíferos, los espermatozoides no pueden penetrar el ovocito después de la eyaculación, si no que requieren un período de incubación en el tracto genital femenino para adquirir la capacidad fertilizante. Esta capacidad es adquirida mediante el proceso de capacitación espermática e implica la desestabilización de la membrana plasmática que conduce, a menos que esté cerca de un ovocito, a la muerte celular (Rodríguez-Martínez, 2007).

La capacitación espermática se produce durante la exposición secuencial de los espermatozoides en los diferentes compartimientos del tracto reproductor femenino durante el transporte espermático (Yanagimachi, 1994). Al inicio del proceso, el potencial de hidrógeno (pH) y la concentración de calcio intracelular aumentan. En consecuencia la adenilciclase se activa y provoca un incremento del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y proteínas específicas (incluyendo señales extracelulares reguladas por proteínas quinasa) que a continuación fosforilan la tirosina. Simultáneamente, la membrana plasmática se vuelve menos estable por redistribución de los fosfolípidos, reducción del colesterol y modificación de las glicoproteínas, lo que conduce a la reacción acrosómica (Hafez; Hafez, 2000b). Los espermatozoides que fueron capacitados adquieren la capacidad de: 1) desprenderse del epitelio del oviducto, 2) penetrar el *cumulus* de células de la granulosa que rodea al ovocito, 3) unirse a los receptores específicos de la zona pelúcida del ovocito y 4) sufrir la reacción acrosómica que permite la penetración de la zona pelúcida y la fusión con el ovocito (Jaiswal *et al.*, 1999). La hipermotilidad espermática es un estado en el que el espermatozoide exhibe una vigorosa y alta amplitud del movimiento flagelar que

estaría regulado por la reacción acrosómica (Marquez; Suarez, 2004). Se consideró como un mecanismo para desprenderse del epitelio del RE y así obtener acceso al sitio de fertilización (Suarez, 2007).

En un estudio *in vitro* sobre espermatozoides de humanos, se demostró que el estado fisiológico de “capacitado” tiene una duración de 50 a 240 minutos, por lo tanto no es estático, sino más bien transitorio y que existe un proceso continuo de sustitución de espermatozoides capacitados dentro de una población de espermatozoides (Cohen-Dayag *et al.*, 1995). En consecuencia, la continua sustitución de los espermatozoides capacitados es una población heterogénea, que incluye células que aún no han iniciado el proceso de capacitación, células en diferentes etapas de la capacitación, plenamente capacitadas, pos-capacitadas y células con reacción del acrosoma (Jaiswal *et al.*, 1999). Por otro lado, un estudio reciente realizado en ratones sugirió que los espermatozoides que sufren reacción acrosómica llegan con mayor facilidad a la zona pelúcida a través del *cumulus* que los espermatozoides que no sufrieron ningún cambio estructural (Jin *et al.*, 2011).

2.5. Fecundación

Después de la ovulación, el ovocito es atrapado por el infundíbulo y conducido hasta la ampolla del oviducto donde ocurre la fecundación. El transporte del ovocito en el oviducto se realiza mediante contracciones musculares y movimiento ciliares.

En especies con ovulación espontánea, el tiempo de supervivencia de los espermatozoides y la vida media de los ovocitos se ajusta al período entre el comienzo del estro y la ovulación. En el bovino, la capacidad fertilizante del espermatozoide se mantiene por 24-48 hs y la vida media del ovocito varía entre 8-20 hs (Bedford, 1974). La pérdida de la viabilidad del óvulo es gradual por lo que durante su envejecimiento pierde la capacidad para ser fertilizado normalmente.

2.6. Inseminación artificial

2.6.1. Sucesos históricos relevantes

La inseminación artificial (IA) es la primera biotecnología que se aplicó para incorporar mejor genética y evitar las enfermedades venéreas en los animales de granja. El primer hecho documentado de IA fue el de Spallanzani en 1784, quién inseminó una perra que 62 días más tarde parió tres cachorros.

Ivanoff (1899) en Rusia comienza los estudios sobre la IA y luego de la primera guerra mundial promueve la técnica como un procedimiento práctico para restaurar y desarrollar la ganadería en Rusia, mediante el aumento del número de animales domésticos mejorados genéticamente. La noticia de la amplia utilización de la IA en Rusia despertó el interés primero en Europa y luego en América. Sin embargo, la aplicación comercial de la IA tuvo lugar en Dinamarca recién en 1936, con la creación de la primera cooperativa lechera donde se inseminaron 1070 vacas en el primer año con el 59 % de preñez. Los veterinarios daneses fueron quienes establecieron el método de fijación recto-vaginal del cuello uterino y la deposición del semen profundamente en el cuello o en el cuerpo del útero. Más tarde, en 1940 Sørensen inventó el tubo de celofán parafinado para empaquetar el semen (Foote, 2002).

Salisbury *et al.* (1941) en Estados Unidos de América descubrieron un diluyente para el semen a base de citrato de sodio y yema de huevo. En el ganado vacuno, este hallazgo resultó de fundamental importancia porque permitió ampliar el volumen del eyaculado y mantenerlo durante 72 horas entre 2 y 5°C con el uso de hielo y conservadoras de poliestireno expandido. Más tarde (1949), en Inglaterra, fue informado que la adición de glicerol al diluyente producía un efecto crioprotector sobre espermatozoides sometidos a baja temperatura. Este descubrimiento permitió mantener al semen con vida indefinidamente, sin alterar su capacidad fecundante. El semen era conservado en recipientes de vidrio a una temperatura de -79°C lograda con alcohol metílico y hielo seco (dióxido de carbono sólido). Sin bien los primeros experimentos se realizaron con semen de gallo, más tarde se aplicó en toros (Polge *et al.*, 1949).

Por otro lado, en 1964, Cassou tuvo en cuenta la idea de Sorensen (empaquetamiento de semen) y creó las pajuelas y el aplicador (pistola o jeringa de Cassou) que actualmente es utilizado en todo el mundo.

Obviamente, el éxito reproductivo de la IA depende de la adecuada detección del celo y la correcta aplicación de la técnica. El momento de la inseminación respecto al inicio del celo fue establecido por Trimberger en 1948 y se basó en la regla A.M.-P.M. y P.M.-A.M., es decir que los animales detectados en celo a la mañana se inseminan a la tarde y viceversa (Foote, 2002).

Alrededor de 1970, se demostró que la fertilidad de las inseminaciones realizadas en el cuerpo uterino fue mayor que la obtenida de las inseminaciones realizadas en el cérvix (Macpherson, 1968; Moller *et al.*, 1972).

La utilización de tratamientos exitosos para el control de la ovulación permitió aumentar el número de vacas para carne inseminadas artificialmente (Dziuk; Beuows, 1983). Hace más de 60 años que se investiga sobre métodos para sincronizar e inducir el celo y la ovulación; los primeros intentos se realizaron con aplicaciones diarias de progesterona (Ulberg *et al.*, 1951).

2.6.2. Inseminación artificial a tiempo fijo

En Argentina, la cría bovina se realiza de forma extensiva en ambientes productivamente marginales. De manera que, una biotecnología reproductiva para que sea aplicada sistemáticamente es necesario que presente facilidades en el manejo de los animales.

Actualmente la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es la principal biotecnología aplicada en programas de mejoramiento genético en establecimientos dedicados a la cría bovina, principalmente por no presentar dificultades operativas relacionadas con la detección del celo.

Los programas de sincronización e inducción de celo/ovulación facilitan la IATF. Además, presentan una ventaja adicional al reducir el período de anestro posparto (Alberio *et al.*, 1986; Mapletoft *et al.*, 1999; Yavas; Walton, 2000).

La IATF permite reducir los intervalos parto-primer celo y entre partos, reducir la temporada de parición y obtener terneros uniformes en edad.

2.6.3. Factores que afectan la tasa de gestación en un programa de IATF

2.6.3.1. Aspectos relacionados con la calidad del semen criopreservado y con el número de espermatozoides por dosis

La criopreservación de semen es una técnica que permite beneficiar la cría de animales domésticos de importancia económica y contribuir a la conservación de especies en extinción.

En los mamíferos, la tasa de gestación es menor cuando los animales son inseminados artificialmente con semen criopreservado que cuando son inseminados con semen fresco. Esto se debería a que, durante el proceso de congelación-descongelación, se pierden espermatozoides viables y a que una proporción de los sobrevivientes sufren alteraciones estructurales y funcionales (Nagy *et al.*, 2004).

Las pérdidas por muerte de espermatozoides durante el proceso de congelado se debe a cambios de temperatura -shock por frío- (Drobnis *et al.*, 1993), a los efectos osmóticos y tóxicos que producen las concentraciones de los agentes crioprotectores, y a la formación de hielo en el medio extracelular asociados a la presión osmótica (Watson; Duncan, 1988).

Los espermatozoides que sobreviven a la congelación-descongelación sufren cambios similares a la capacitación, lo que explicaría que la vida media es más corta comparada con los espermatozoides de un semen que no fue congelado -semen fresco- (Watson, 1995).

La motilidad de los espermatozoides se vería comprometida luego de la congelación-descongelación. Sólo una pequeña subpoblación mantendría la motilidad rectilínea progresiva (Watson, 2000). Además, la criopreservación induce la formación de especies oxígeno reactivos, estos agentes oxidantes provocan efectos negativos sobre la función de los espermatozoides (O'Flaherty *et al.*, 1997).

Los cambios superficiales de la membrana plasmática producidos por la criopreservación afectarían la capacidad de interacción con el epitelio oviductal (Ellington *et al.*, 1999).

En general, los efectos negativos de la técnica de criopreservación de semen sobre los espermatozoides son compensados por el número de espermatozoides que se usan en la IATF.

Es evidente que hay diferencias en la fertilidad entre los toros. Durante varias décadas se estudiaron varios rasgos seminales para predecir el desempeño reproductivo de los toros. Actualmente los indicadores más importantes para evaluar la fertilidad son la motilidad espermática y la morfología. Sin embargo, la determinación de las diferencias en fertilidad entre los toros requiere la inseminación de varios miles de animales del mismo centro comercial de semen.

Saacke *et al.* (2000) clasificaron y describieron las características de los parámetros de calidad seminal compensables y no compensables. Los parámetros compensables están relacionados a problemas de morfología y de motilidad progresiva lo que dificulta atravesar las barreras naturales del tracto genital femenino, alcanzar el ovocito, penetrar la zona pelúcida y bloquear la polispermia. Por lo consiguiente, los parámetros compensables pueden ser minimizados aumentando la dosis inseminante. El ajuste de la dosis inseminante, debido a que son pocos los parámetros compensables evaluados, se realiza teniendo en cuenta los datos de fertilidad de un gran número de IA. En cambio, los efectos de los parámetros seminales no compensables, no pueden ser minimizados mediante el ajuste de la dosis inseminante, porque los espermatozoides no pueden completar la fertilización (unión de los pronúcleos) y mantener el desarrollo embrionario temprano.

El semen que presenta parámetros seminales no compensables está relacionado a anomalías espermáticas. No obstante, podría ser que la cabeza del espermatozoide es morfológicamente normal, pero presentan vacuolas (diadema y cráteres) que podrían indicar un daño en la estructura de la cromatina al igual que en un espermatozoide morfológicamente anormal. Un daño en la estructura de la cromatina podría dificultar la descondensación del núcleo del espermatozoide y el desarrollo del pronúcleo masculino (Dalton, 2013).

En un trabajo donde se evaluó el efecto del semen de toros clasificados como de calidad media o de calidad por debajo de la media, según el porcentaje de anomalías espermáticas, sobre la calidad de los embriones, se concluyó que cuando se utilizó semen de calidad media, el porcentaje de embriones excelentes y buenos fue mayor que cuando se utilizó semen de calidad por debajo de la media (DeJarnette *et al.*, 1992).

2.6.3.2. Aspectos relacionados con la hembra

El anestro posparto, es definido como el período fisiológico que ocurre en la hembra desde el parto hasta el primer estro (Short *et al.*, 1990). Eventualmente puede ocurrir la primera ovulación sin manifestación de celo, por lo tanto el período de subfertilidad sería más prolongado (Stevenson *et al.*, 1997).

Durante este período, se producen fundamentalmente dos cambios: la involución uterina y el restablecimiento funcional del eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero que conduce a la actividad sexual cíclica (Rivera; Alberio, 1991).

La primera limitante para que se restablezca la actividad ovárica posparto es la baja concentración sérica de LH. Entre 15 y 30 días posparto son necesarios para el restablecimiento de la concentración de LH (Short *et al.*, 1990). La duración del anestro posparto es variable y frecuentemente supera los 80 días en vacas para carne (Wright *et al.*, 1992). Los factores que se asocian a esta variación, entre los más importantes son: el amamantamiento, la condición corporal, la época de parición, la edad y la cantidad de partos previos (Williams, 1990; Yavas; Walton, 2000).

El amamantamiento es el principal efecto inhibitorio de la actividad cíclica posparto (Short *et al.*, 1990), incluso la sola presencia del ternero al pie de la madre produciría un anestro posparto más prolongado (Lamb *et al.*, 2001).

La baja condición corporal (CC) asociada a una alimentación insuficiente incrementa el número de días entre el parto y el primer celo y es la principal causa de falla en la concepción en vacas para carne durante la temporada de servicio (Wettemann *et al.*, 2003). También se ha demostrado el efecto negativo de la baja CC sobre la tasa de concepción en vacas que fueron inseminadas a tiempo fijo en Brasil y en Argentina. Una CC de 2,5 en una escala de 1 a 5, es la mínima aceptable para realizar con éxito una IATF (Baruselli *et al.*, 2003; Cutaia *et al.*, 2003). En vacas para carne sometidas a un programa de sincronización e inducción de celo/ovulación, la tasa de gestación de una IATF es afectada por el amamantamiento (Vittone *et al.*, 2011) y la condición corporal (Lamb *et al.*, 2001; Sá Filho *et al.*, 2010a).

2.6.3.3. Aspectos relacionados con la aplicación de la técnica

2.6.3.3.1. Tratamientos de sincronización de celo/ovulación

El momento de la inseminación respecto a la ovulación tiene un impacto significativo sobre la fertilidad. Por lo tanto, el esfuerzo de la investigación se ha centrado en la sincronización de la ovulación, de manera que, los tratamientos hormonales tienden a disminuir la variación en el tiempo de las ovulaciones (Bó *et al.*, 2003).

Existen diversos protocolos de sincronización e inducción de celo/ovulación para la IATF, donde se propone una combinación de hormonas que se basa en la manipulación de la fase folicular y lútea del ciclo estral mediante:

- 1) la sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular por medio de la inducción de la ovulación [(GnRH, LH o gonadotropina coriónica humana (hCG)] o la inducción de la atresia folicular (combinación de progesterona y estradiol) (Bó *et al.*, 1995).
- 2) el control de la duración de la fase lútea, se realiza mediante agentes luteolíticos (prostaglandinas o sus análogos) o agentes que imiten la acción de un cuerpo lúteo (implantes de liberación lenta de progesterona o progestágenos) (Odde, 1990).
- 3) la inducción de la ovulación del folículo dominante con una inyección de GnRH, LH, hCG o sales de estradiol (Twagiramungu *et al.*, 1995; Sales *et al.*, 2012).

El dispositivo intravaginal impregnado en progesterona mantiene una concentración plasmática de progesterona adecuada por un período determinado que imita a un CL activo de vida media corta (Fike *et al.*, 1997). Al retirarse el mismo, la concentración sérica de progesterona desciende hasta niveles subluteales y en consecuencia aumenta la frecuencia del pulso de LH, que induce el crecimiento folicular e impide la atresia del folículo dominante (Savio *et al.*, 1993).

El tratamiento comúnmente utilizado en Argentina para la sincronización e inducción del celo y la ovulación para la IATF comprende: la aplicación de una dosis de 2 mg de benzoato de estradiol y un dispositivo intravaginal impregnado con 0,5 ó 1 g de progesterona para la emergencia de una nueva onda folicular. Para controlar la duración de la fase luteal, se retira el dispositivo a los 7 u 8 días y se realiza una inyección de 500 µg de un análogo de la prostaglandina. La inducción de la ovulación

es realizada mediante una inyección de 0,5 mg de cipionato de estradiol al retiro del dispositivo o una inyección de 1 mg de benzoato de estradiol a las 24 hs de retirado el dispositivo. En vacas para carne con baja CC, se recomienda la aplicación de una dosis de 400 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG) al retiro del dispositivo porque posibilita la sincronización eficiente de la ovulación estimulando el crecimiento folicular (Baruselli *et al.*, 2009).

Cuando se realiza una IATF, la manifestación de celo podría mejorar la tasa de gestación. En Argentina, se logró mejorar la tasa de gestación en vacas que fueron detectadas en celo (mediante la desaparición del pintado en la base de la cola) comparada con vacas que no manifestaron celo después de la aplicación de un protocolo de sincronización/inducción de celo/ovulación para IATF basado en progestágeno/estrógeno (Starhinger *et al.*, 2011).

El cumplimiento del protocolo de sincronización (dosis, vías y horarios de administración de hormonas) es muy importante para el lograr el éxito de un programa de IATF. Sin embargo, los resultados de fertilidad son variables. La CC, la manifestación de estro y la utilización o no de eCG podrían explicar en parte estas variaciones.

2.6.3.3.2. Lugar de deposición del semen

En los rodeos de cría, la IATF se realiza mediante el método convencional que consiste en la deposición del semen en el cuerpo del útero. Actualmente, con la necesidad de aumentar la eficiencia biológica de la IATF y con el advenimiento de nuevas técnicas reproductivas, como la IA con semen sexado, podría necesitarse de la IA intrauterina profunda asociada a un número reducido de espermatozoides por dosis (Seidel *et al.*, 1997).

La inseminación intrauterina profunda se mencionó como de importancia para reducir la incidencia de la deposición del semen en el cuello uterino (López-Gatius, 2000). Sin embargo, se realizaron varios trabajos basados en la idea de que el istmo caudal del oviducto es el reservorio espermático funcional (Hunter; Wilmut, 1984) y en consecuencia, la deposición seminal cercana a la unión útero-tubárica podría mejorar la tasa de gestación respecto de la deposición en el cuerpo uterino. Por un lado, Senger *et al.* (1988) pusieron a prueba la IA bicornual que consiste en la deposición profunda de la mitad de una dosis de semen en un cuerno uterino y la otra mitad en el

otro cuerno uterino y obtuvieron una mejora en la tasa de gestación comparada con la IA en el cuerpo uterino. Por otro lado, la deposición del semen puede ser realizada en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con folículo preovulatorio detectado mediante la palpación (López-Gatius; Camón-Urgel, 1988) o la ecografía transrectal de los ovarios (Kurykin *et al.*, 2006). La inseminación unicornual profunda se realiza mediante la manipulación suave de la curvatura mayor del cuerno uterino para introducir un cateter que contenga el semen, el cual es depositado en el extremo craneal del cuerno (López-Gatius; Camón-Urgel, 1988).

2.6.3.3.3. Momento de la IATF

El momento óptimo para la IA se refiere al momento más adecuado para alcanzar una mayor tasa de gestación. Este momento depende de la vida media del ovocito y del espermatozoide en el tracto genital femenino (Hunter; Wilmut, 1984).

El intervalo entre el inicio del estro natural o inducido por PGF_{2α} y la ovulación es de 27 hs aproximadamente (Walker *et al.*, 1996; Pinheiro *et al.*, 1998).

Estudios previos concluyeron sobre el momento óptimo para realizar la IA en relación al momento de la ovulación. Dransfield *et al.* (1998) determinaron que la probabilidad de que ocurra la concepción disminuye a medida que la IA se aproxima al momento de la ovulación y que debería realizarse entre 4 y 12 hs después del inicio del estro. De manera similar, Dalton *et al.* (2001) informaron que la IA debería realizarse poco antes (12 hs) de que ocurra la ovulación para maximizar la disponibilidad de espermatozoides aptos para la fecundación, pero no demasiado tarde porque el ovocito podría sufrir un envejecimiento hasta la llegada de los espermatozoides. De manera que, la tasa de concepción disminuiría notablemente cuando la IA se realiza luego de la ovulación.

En los programas de sincronización e inducción de celo/ovulación, la IA se realiza en momentos fijos predeterminados. En general, se realiza antes de la ocurrencia de la mayoría de las ovulaciones, lo cual depende del tratamiento hormonal utilizado. Por esta razón, el requisito fundamental que debe cumplir un tratamiento de sincronización de celo/ovulación es concentrar las ovulaciones.

Con los tratamientos de sincronización basados en el uso de progesterona/estrógeno, en la mayoría de los animales, las ovulaciones ocurren después de las 65 hs de retirado el dispositivo impregnado con progesterona (Avilés *et*

al., 2005; Sales *et al.*, 2011). Por lo tanto, la IATF se realiza entre 48 - 56 hs después del retiro del dispositivo (Pincinato *et al.*, 2005; Manes *et al.*, 2012).

2.6.3.3.4. Inseminador

La eficiencia del inseminador depende del manejo del semen y la capacidad del técnico para depositar el semen en el cuerpo del útero. Respecto del manejo del semen, el inseminador debe contar con la identificación precisa y de fácil lectura de las dosis de semen dispuestas en el termo con nitrógeno líquido. De modo que, las pajuelas pueden ser localizadas y retiradas del termo rápidamente para evitar la exposición del semen a temperatura ambiente. Cuando se retira una pajuela del termo con nitrógeno líquido, es imperativo que el técnico mantenga el canastillo lo más bajo posible en el cuello del termo.

La temperatura del nitrógeno líquido en un termo para conservar el semen es -196 °C. Por otro lado, se indicó que temperaturas por encima de los -79 °C producen una disminución de la motilidad espermática (Bean *et al.*, 1963). Esto podría deberse al daño celular causado por una reorganización de los pequeños cristales de hielo presentes en el fluido extracelular en cristales más grandes. Este proceso se llevaría a cabo durante los cambios sucesivos de temperatura por debajo y por encima de -130 °C. Este efecto biológico se llama recristalización. El daño ocurre cuando los cristales grandes de hielo invaden físicamente la membrana y los organelas intracelulares. La severidad del daño celular depende del valor al que asciende la temperatura y de la duración a la exposición a temperaturas por encima de -130 °C (Stroud, 2012).

En el termo lleno de nitrógeno líquido, la elevación de las pajuelas con semen en el cuello del termo por períodos de aproximadamente 1 minuto dio lugar a un aumento de temperatura de 15 °C (-196 a -180 °C). Sin embargo, cuando el nivel de nitrógeno líquido en el termo estuvo en 14 cm aproximadamente, la temperatura de las pajuelas con semen en el cuello del termo aumentó 72 °C (-196 hasta -124 °C) y cuando fueron retiradas e introducidas en el termo repetidas veces no volvieron a tener una temperatura de -196 °C (Perry *et al.*, 2011).

Cuando numerosas vacas deben ser inseminadas en un día, son descongeladas múltiples dosis de semen simultáneamente para facilitar la IA. Dalton *et al.* (2004) realizaron un experimento para determinar: a) el efecto de la descongelación simultánea de múltiples pajuelas de 0,5 ml y la secuencia de la inseminación (primera,

segunda, tercera o cuarta) b) el efecto del inseminador (profesionales y no profesionales) y c) el efecto del tiempo transcurrido desde el inicio de la descongelación de la pajueta hasta la deposición seminal en el útero sobre la tasa de concepción. La tasa de concepción difirió entre inseminadores profesionales y no profesionales (45% vs 27%, respectivamente), pero el tiempo de descongelación, la secuencia de la inseminación y el tiempo transcurrido (no más de 15 minutos para la cuarta pajueta) entre la descongelación y la deposición seminal no tuvo efecto sobre la tasa de concepción.

2.7. Factores que afectan el sexo de la cría

Actualmente la selección del sexo de la cría es un hecho; la citometría de flujo es el método más exacto por el cual los espermatozoides son seleccionados de acuerdo al tipo de cromosoma -X o Y- (Johnson; Welch, 1999) . Sin embargo, existen varios factores que podrían afectar la proporción del sexo de las crías cuando se utiliza semen sin sexar. De acuerdo a algunos estudios, los factores que podrían influir sobre la proporción del sexo de las crías en los bovinos son: la concentración de testosterona en el líquido folicular del folículo preovulatorio (Grant; Irwin, 2005; Grant et al., 2008), el estado de maduración del ovocito (Dominko; First, 1997), el ovario (derecho o izquierdo) del cual proviene el ovocito que dará origen al embrión (Hylan et al., 2009), el lugar de deposición del semen y el momento de la inseminación (Wehner et al., 1997).

Hay evidencias que indican que existen asociaciones entre la condición corporal y/o el dominio comportamental de la madre y la proporción del sexo de la descendencia. La condición corporal adecuada y/o la dominancia materna permitirían una mayor proporción de descendencia masculina (Sheldon; West, 2004). Probablemente, la buena condición corporal sea una consecuencia de la dominancia materna y ésta de la concentración sérica de testosterona en los mamíferos (Bouissou, 1978). En los seres humanos, se demostró que las mujeres dominantes concibieron más hijos varones que las mujeres no dominantes (Grant, 1994). Grant *et al.* (2008), demostraron que los ovocitos de bovinos que se desarrollaron en folículos que contenían alta concentración de testosterona aumentaron la probabilidad de ser fertilizados con espermatozoides con cromosomas Y que con cromosomas X.

Varios autores describieron la distribución asimétrica de los sexos dentro del útero en mamíferos politocos. Encontraron una mayor proporción de fetos femeninos en el cuerno uterino derecho en la coneja (YoungLai *et al.*, 1981), mientras que en el ratón y en el jerbo mongol encontraron mayor cantidad de fetos de sexo masculino (Clark *et al.*, 1991). Un estudio realizado en la especie bovina reveló que la proporción de terneros macho gestados en el cuerno uterino derecho fue mayor que en el cuerno uterino izquierdo. Pero, la proporción de terneros macho no fue diferente entre cuernos cuando se realizó transferencia embrionaria. Por lo tanto, se concluyó que los factores de selección del sexo probablemente provienen del ovario que da origen al ovocito (Hylan *et al.*, 2009).

El retraso de la inseminación produjo proporciones mayores de embriones bovinos de sexo masculino que de embriones de sexo femenino (Dominko; First, 1997). Por lo que, estos autores sugirieron que el estado de maduración del ovocito en el momento de la inseminación puede ser responsable del procesamiento preferencial del espermatozoide con cromosomas X o Y.

De acuerdo a los estudios realizados en espermatozoides de varias especies domésticas se observó que los espermatozoides con cromosomas X presentan mayor cantidad de ADN que los cromosomas Y, en el caso de la especie bovina el espermatozoide con cromosomas X tienen 3,8 % más cantidad de ADN que los Y (Garner, 2006). Además, se sugirió que los espermatozoides con cromosomas Y podrían capacitarse antes que los X y por lo tanto, a medida que transcurre el tiempo luego de la IA, la motilidad, la capacitación y el tiempo de supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino podrían ser diferentes entre espermatozoides con cromosoma X e Y (Wehner *et al.*, 1997). De manera que, el momento de la IA después de iniciado el estro y el lugar de deposición del semen podrían influir en la proporción del sexo de la cría.

Martínez *et al.* (2004) encontraron que la proporción de terneros hembra es mayor cuando la IA se realiza pocas horas después de iniciado el estro que cuando se realiza más tarde. Estos autores hipotetizaron que los resultados obtenidos podrían deberse a diferencias en la capacitación y en el transporte de los espermatozoides con cromosoma X o Y. Por otro lado, Zobel *et al.* (2011) llevaron a cabo un trabajo para determinar si el lugar de deposición de semen en el útero podría afectar la proporción del sexo de los terneros. Los resultados que obtuvieron demostraron que la proporción de terneros macho fue mayor cuando la deposición del semen se realizó en el cuerpo del útero, que cuando se realizó profundamente en el cuerno uterino.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Experimento 1: “*Vacas sin cría*”

3.1.1. Animales y lugar experimental

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce (Buenos Aires) en diciembre de 2010. Se utilizaron 67 vacas Aberdeen Angus, múltiparas y sin cría. Los animales se mantuvieron juntos en condiciones de pastoreo sobre pastura natural.

3.1.2. Tratamiento hormonal y semen utilizado

Todos los animales fueron tratados con un dispositivo intravaginal impregnado con 0,5 g de progesterona (DIB, Syntex, Argentina). Al momento de colocar el dispositivo (día 0) se aplicó una inyección de 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Benzoato de estradiol, Syntex, Argentina; i.m.). Al retiro del DIB (día 7) se aplicó una dosis de 500 µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex, Argentina; i.m.). Veinticuatro horas más tarde (día 8) se aplicó 1 mg de BE y a las 54-56 hs de retirado el DIB (día 9) se realizó la IATF. Todas las inseminaciones fueron realizadas por un mismo operador. Se utilizó semen proveniente de un toro de raza Aberdeen Angus de probada fertilidad. De un mismo eyaculado se procesaron (congelación) pajuelas de 0,5 ml con dosis reducida de espermatozoides (DRE=8 millones totales) y con dosis convencional de espermatozoides (DCE=40 millones totales). Previo al inicio del experimento, tres pajuelas de cada dosis de espermatozoides fueron seleccionadas al azar y evaluadas pos-descongelación (37 °C/1 minuto). Las muestras, presentaron valores mínimos de motilidad progresiva rectilínea=50%, vigor=3 (escala de 1 a 5), morfología espermática normal=88% y espermatozoides viables=68% (eosina-nigrosina). Las determinaciones se realizaron de acuerdo a lo recomendado por el Western College of Veterinary Medicine, Department of Herd Medicine and Theriogenology University of Saskatchewan, Canadá (Barth, 1995).

3.1.3. Estudios ecográficos

Las ecografías se realizaron por vía transrectal mediante un transductor lineal de 7,5 MHz conectado a un ecógrafo ALOKA 500 SD. Los ovarios de cada vaca fueron monitoreados a las 24 hs de retirado el dispositivo intravaginal (día 8) con la finalidad de determinar el ovario (izquierdo o derecho) con el folículo de mayor tamaño presuntamente dominante (FD) y medir el diámetro (mm) del FD. Al momento de la IATF (Día 9) se determinó la presencia o ausencia (ovulación pre-IATF) del FD. Por lo tanto, el momento de ovulación se definió como antes o después de la IATF.

La ovulación se confirmó 10 días después de la IATF por la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario donde se encontraba el FD.

El diagnóstico de gestación se realizó a los 35 días de la IATF.

3.1.4. Diseño experimental

Con la finalidad de disminuir las fuentes de variación y tener unidades experimentales homogéneas se excluyeron dos vacas que habían perdido el DIB. En consecuencia, un total de 65 vacas fueron distribuidas en cuatro tratamientos (T) de acuerdo a la CC: T1 (Control): IA en el cuerpo del útero con una DCE, T2: IA en el cuerpo del útero con una DRE, T3: IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE y T4: doble IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE (una IA a las 54-56 hs y la otra 16 hs más tarde). Por último se aplicó un segundo criterio de exclusión, la ausencia de ovulación, por lo cual se excluyeron seis vacas del experimento. De manera que fueron tenidos en cuenta para el análisis estadístico del experimento los datos completos de 59 animales.

La CC fue de $6,9 \pm 0,04$ (media \pm EEM) (escala de 1 a 9) y con el propósito de evaluar el efecto de la CC al inicio del experimento sobre la tasa de gestación, los animales fueron clasificados en: CC 6 ó CC 7 (Herd; Sprott, 1996).

El sexo de las crías fue registrado después del parto. Se detectaron cinco pérdidas de gestación en 35 vacas preñadas. Por lo tanto, se registró un total de 30 crías (T1: n=5, T2: n=8, T3: n=8 y T4: n=9).

En la figura 1 se presenta un esquema de las IATFs en función del protocolo de sincronización e inducción de celo/ovulación y de las observaciones ecográficas realizadas.

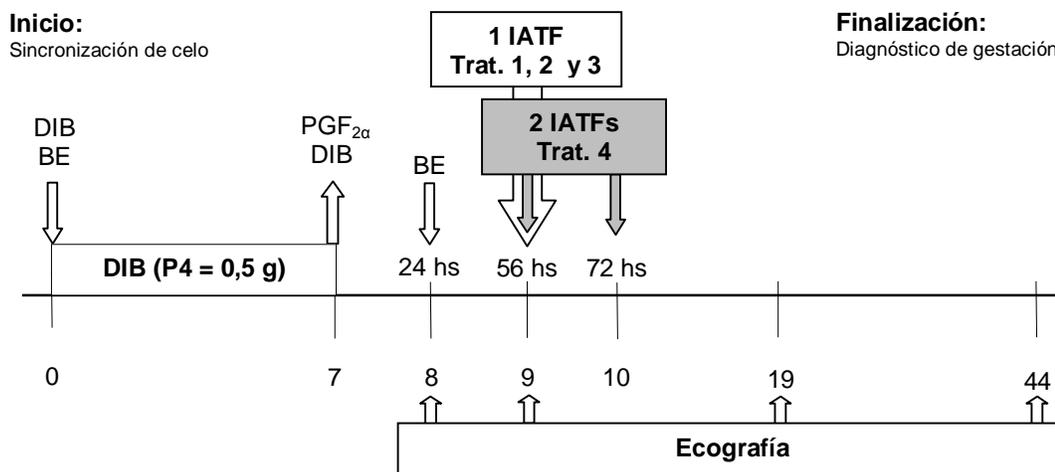


Figura 1: Presentación esquemática del tratamiento hormonal, de las IATFs y de las observaciones ecográficas realizadas en “vacas sin cría”.

3.1.5. Análisis estadísticos

La CC al inicio del experimento, no cumplió con el supuesto de normalidad para realizar el análisis de varianza y fue analizada mediante el test de Kruskal-Wallis por medio del procedimiento (PROC) NPAR1WAY.

El diámetro del FD, por no cumplir con el supuesto de normalidad, fue analizado mediante el test de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY) y las proporciones de animales que ovularon fueron comparadas por medio de la prueba Chi-cuadrado (χ^2 ; PROC FREQ) entre los momentos de ovulación (antes o después de la IATF).

La tasa de gestación (TG) al día 35 después de la IATF fue evaluada mediante regresión logística múltiple por medio del procedimiento LOGISTIC. El modelo inicial incluyó las variables explicativas: CC (6 ó 7), T (1, 2, 3 ó 4), diámetro del FD (rango: 8-11 mm o >11 mm) y momento de ovulación (MOV; antes o después de la IATF), interacción entre T y MOV e interacción entre diámetro del FD y MOV, que mediante la selección del modelo por pasos hacia atrás (backward) fueron eliminadas

secuencialmente las variables con $P > 0,10$ según el estadístico de Wald. Por lo tanto, el modelo final incluyó solamente la variable MOV.

El número de crías obtenido ($n=30$) solo permitió que la proporción del sexo de las crías sea comparada por separado entre los tratamientos o entre las vacas que ovularon en el ovario izquierdo ó derecho. Además, se comparó la proporción del sexo de las crías ($n=21$) según el MOV. Para este último análisis, como la doble IATF (realizada en vacas correspondiente al T4) podría generar efectos confundidos del momento de ovulación sobre la proporción del sexo de las crías, el T4 no fue considerado. La variable binomial utilizada para el estudio fue ternero macho: si/no y fue analizada mediante el Test Exacto de Fisher (PROC FREQ).

El programa estadístico utilizado en todos los procedimientos fue el SAS (1998). Todos los efectos y diferencias se consideraron significativas con valores de $P \leq 0,05$ y con tendencia con $0,05 < P \leq 0,10$.

3.2. Experimento 2: “Vacas con cría”

3.2.1. Animales y lugares experimentales

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Concepción del Uruguay (Entre Ríos) (EEA1) en noviembre-diciembre de 2011 y en la EEA INTA Reconquista (Santa Fe) (EEA2) en enero de 2012. Se utilizaron 200 vacas (EEA1=132 y EEA2=68) multíparas con cría al pie de raza Hereford en la EEA1 y raza Braford en la EEA2. La alimentación se basó en pasturas naturales características de cada zona.

3.2.2. Tratamiento hormonal y semen utilizado

Todos los animales fueron tratados con un dispositivo intravaginal impregnado con 0,5 g de progesterona (DIB, Syntex, Argentina). Al momento de colocar el dispositivo (día 0) se aplicó una inyección de 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Benzoato de estradiol, Syntex, Argentina; i.m.) y se realizó un destete precoz definitivo. Al retiro del dispositivo (día 8) se aplicó una dosis de 500 µg de cloprostenol sódico (Ciclase DL, Syntex, Argentina; i.m.) y 400 UI de gonadotropina coriónica equina (Novormón 5000, Syntex, Argentina; i.m.). Veinticuatro horas más tarde (día 9) se aplicó 1 mg de BE y a las 54-56 hs de retirado los dispositivos (día 10) se realizó la IATF. Todas las inseminaciones fueron realizadas por un mismo operador. Se utilizó semen proveniente de dos toros de probada fertilidad, uno de raza Polled Hereford en la EEA1 y otro de raza Braford en la EEA2. De un mismo eyaculado de cada toro se procesaron (congelación) pajuelas de 0,5 ml con dosis reducida de espermatozoides (DRE=5 millones totales) y con dosis convencional de espermatozoides (DCE=25 millones totales). Previo al inicio del experimento, tres pajuelas de cada dosis de espermatozoides fueron seleccionadas al azar y evaluadas pos-descongelación (37 °C/1 minuto). Las muestras, presentaron valores mínimos de motilidad progresiva rectilínea=45%, vigor=3 (escala de 1 a 5), morfología espermática normal=84% y viables=55% (eosina-nigrosina). Las determinaciones se realizaron de acuerdo a lo recomendado por el Western College of Veterinary Medicine, Department of Herd Medicine and Theriogenology University of Saskatchewan, Canadá (Barth, 1995).

3.2.3. Estudios ecográficos

A las 24 horas de retirado el DIB (día 9) se realizó ecografía ovárica por vía transrectal (FALCO VET 100, 6-8 MHz) con la finalidad de determinar el ovario (izquierdo o derecho) con el folículo de mayor tamaño presuntamente dominante (FD) y sólo en una muestra al azar en la EEA1 (n=52) y en la totalidad de las vacas de la EEA2 (n=68) se midió el diámetro del FD. En estos animales, al momento de la IATF (Día 10), se determinó la presencia o ausencia (ovulación pre-IATF) del FD. Por lo tanto, el momento de ovulación se definió como antes o después de la IATF.

La ovulación se confirmó 10 días después de la IATF por la presencia de un cuerpo lúteo en el ovario donde se encontraba el FD.

El diagnóstico de gestación se realizó a los 35 días de la IATF.

3.2.4. Diseño experimental

Con la finalidad de disminuir las fuentes de variación y tener unidades experimentales homogéneas se determinaron los siguientes criterios de exclusión de vacas: 1) presencia de alteraciones y/o lesiones del aparato reproductor, 2) pérdida del DIB y 3) FD no observado al día 9. Tras la aplicación de estos criterios, 20 vacas (EEA1: n=9 y EEA2: n=11) se excluyeron del experimento. En consecuencia, un total de 180 vacas fueron distribuidas en cuatro tratamientos (T) de acuerdo al intervalo parto-tratamiento (IPT) y condición corporal (CC), de manera que los promedios del IPT y la CC fueran similares entre tratamientos dentro de cada EEA. Los tratamientos en ambas EEA fueron: T1 (Control): IA en el cuerpo del útero con una DCE, T2: IA en el cuerpo del útero con una DRE, T3: IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE y T4: doble IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE (una IA a las 54-56 hs y la otra 16 hs más tarde). Por último, se aplicó el cuarto criterio de exclusión, la ausencia de ovulación, por lo cual se excluyeron tres vacas del experimento. De manera que, fueron tenidos en cuenta para el análisis estadístico del experimento los datos completos de 177 animales (EEA1: n=122 y EEA2: n=55). Cuando se consideró el diámetro del FD y el MOV fueron tenidos en cuenta para el análisis estadístico los datos completos de 106 animales (EEA1: n=51 y EEA2: n=55) con una distribución homogénea del número de animales entre tratamientos (T1: n=28, T2: n=27, T3: n=26 y T4: n=25).

La CC fue de $3,9 \pm 0,07$ (media \pm EEM) (escala de 1 a 9) y con el propósito de evaluar el efecto de la CC al inicio del experimento sobre la tasa de gestación, los animales fueron clasificados en: CC baja (2 y 3), CC límite (4) y CC óptima (5 y 6) (Herd; Sprott, 1996). El IPT fue de $62,9 \pm 1,2$ días (promedio \pm EEM) con un rango de 35 a 94 días.

El sexo de las crías fue registrado después del parto. En la EEA1 se detectaron tres pérdidas de gestación en 49 vacas preñadas. Mientras que, en la EEA2 se detectaron cinco pérdidas de gestación en 25 vacas preñadas. Por lo tanto, se registró un total de 66 crías [EEA1: n=46 (T1: n=10, T2: n=5, T3: n=17 y T4: n=14) y EEA2: n=20 (T1: n=6, T2: n=6, T3: n=6 y T4: n=2)]. En las vacas (n=106) donde se observó el MOV, se debió registrar 45 crías, pero sólo se registró un total de 40 crías (EEA1: n=20 y EEA2: n=20) debido a las pérdidas de gestación mencionadas. En consecuencia, la distribución del número de las crías en los tratamientos, fue: T1: n=11, T2: n=8, T3: n=14 y T4: n=7.

En la figura 2 se presenta un esquema de las IATFs en función del protocolo de sincronización e inducción de celo/ovulación y de las observaciones ecográficas realizadas.

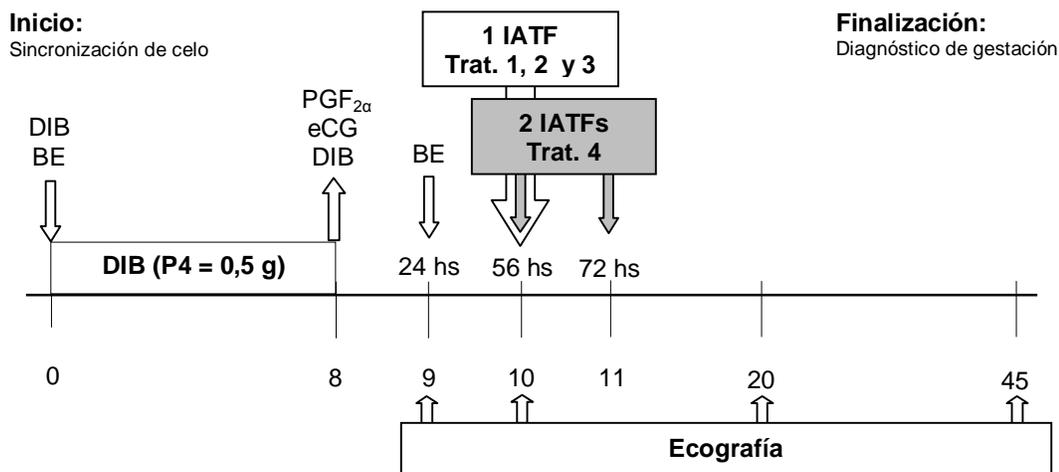


Figura 2: Presentación esquemática del tratamiento hormonal, de las IATFs y de las observaciones ecográficas realizadas en “vacas con cría”.

3.2.5. Análisis estadísticos

La CC al inicio del experimento no cumplió con el supuesto de normalidad necesario para realizar el análisis de varianza y fue analizada mediante el test de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY). Mientras, que el IPT fue analizado mediante el análisis de varianza (PROC GLM).

Se realizó un análisis adicional (n=106) sobre el diámetro del FD y la proporción de animales que ovularon según el MOV (antes o después de la IATF). El diámetro del FD se analizó por medio de un modelo lineal generalizado para distribuciones normales (PROC GLM) y las proporciones de animales que ovularon fueron comparadas por medio de la prueba X^2 (PROC FREQ).

La TG (n=177) al día 35 después de la IATF fue analizada mediante regresión logística múltiple y se utilizó el procedimiento LOGISTIC. El modelo inicial incluyó las variables explicativas: IPT (covariable), EEA (EEA1 o EEA2, incluye los efectos del toro y la raza de vacas), CC (baja, límite u óptima), T (1, 2, 3 ó 4), interacción entre EEA y T e interacción entre CC y T, que mediante la selección del modelo por pasos hacia atrás (backward) fueron eliminadas secuencialmente las variables con $P > 0,10$ según el estadístico de Wald. Por lo tanto, el modelo final incluyó solamente la variable T. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por medio de contrastes con la prueba X^2 (PROC GENMOD).

Cuando se consideró el diámetro del FD y el MOV, la TG (n=106) al día 35 después de la IATF fue analizada del mismo modo que para el total de animales, pero el modelo inicial incluyó las variables explicativas: IPT (covariable), EEA, CC, T, rangos del diámetro del FD (8-11 mm o >11 mm), MOV (antes o después de la IATF), interacción entre T y MOV e interacción entre diámetro del FD y MOV. Luego de la selección de variables (estadístico de Wald), el modelo final incluyó la variable diámetro del FD, MOV y su interacción. La interacción fue evaluada por medio de contrastes mediante la prueba X^2 (PROC GENMOD).

El número de crías obtenido (n=66) sólo permitió que la proporción del sexo de las crías sea comparada por separado entre las EEAs, entre los tratamientos o entre las vacas que ovularon en el ovario izquierdo ó derecho. Además, se comparó la proporción del sexo de las crías (n=33) según el MOV. Para este último análisis, como la doble IATF (realizada en vacas correspondiente al T4) podría generar efectos confundidos del momento de ovulación sobre la proporción del sexo de las crías, el T4

no fue considerado. La variable binomial utilizada para el estudio fue ternero macho: si/no y fue analizada mediante el Test Exacto de Fisher (PROC FREQ).

El programa estadístico utilizado en todos los procedimientos fue el SAS (1998). Todos los efectos y diferencias se consideraron significativas con valores de $P \leq 0,05$ y con tendencia con $0,05 < P \leq 0,10$.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: “Vacas sin cría”

4.1.1. Condición corporal

No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre tratamientos en la condición corporal en vacas que ovularon (Cuadro 1).

Cuadro 1: Condición corporal (CC) al inicio del experimento en “vacas sin cría” que ovularon.

Variable	Tratamiento				P-valor
	1	2	3	4	
n= 59	13	17	14	15	-
CC (media±EEM)	6,8±0,1	6,8±0,1	7,0±0,1	6,9±0,1	0,972

Tratamiento: T1 (Control): IA en el cuerpo del útero con una DCE; T2: IA en el cuerpo del útero con una DRE; T3: IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE y T4: doble IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE.

4.1.2. Diámetro del folículo dominante y proporción de animales que ovularon según el momento de ovulación

En la totalidad (n=59) de vacas que ovularon, el diámetro promedio del FD a las 24 hs de retirado el DIB fue de 9,9±0,3 mm (±EEM).

No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) ni en el diámetro del FD ni en la proporción de animales que ovularon según el MOV (Cuadro 2).

Cuadro 2: Diámetro del folículo dominante (FD; mm) a las 24 hs de retirado el DIB y proporción (%) de animales que ovularon según el momento de ovulación en “vacas sin cría”.

Variable	Momento de ovulación		P-valor
	Antes de la IATF	Después de la IATF	
Diámetro FD (promedio±EEM)	10,3±0,5	9,6±0,3	0,744
Proporción de vacas que ovularon (n)	40,1 (24/59)	59,3 (35/59)	0,152

4.1.3. Tasa de gestación según el tratamiento

La TG no fue afectada ($P>0,10$) por el tratamiento en vacas que ovularon (Figura 3).

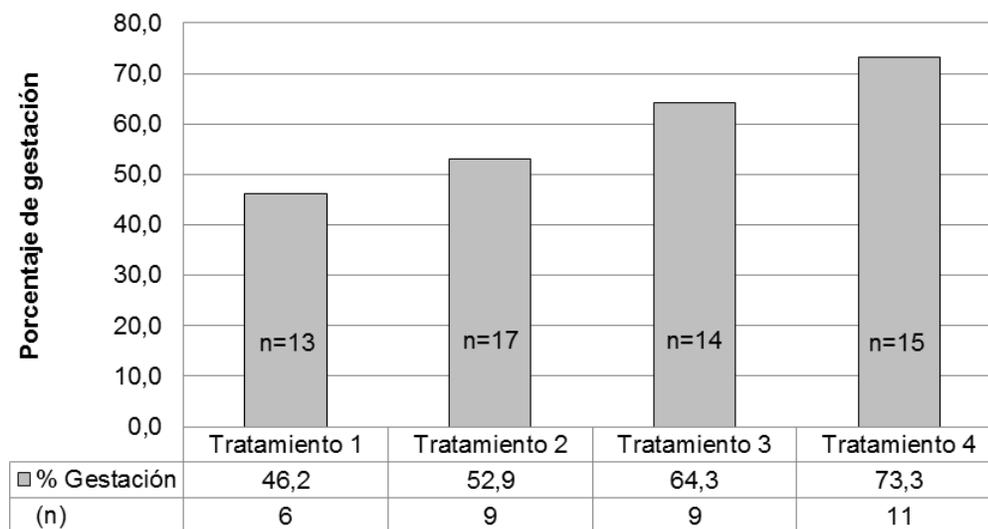


Figura 3: Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) para los diferentes tratamientos [T1 (Control): IA en el cuerpo del útero con una DCE; T2: IA en el cuerpo del útero con una DRE; T3: IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE y T4: doble IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE] en “vacas sin cría”.

4.1.4. Tasa de gestación según el diámetro del FD al proestro y el momento de ovulación

La TG no fue afectada ($P>0,10$) por la interacción entre el diámetro del FD y el momento de ovulación. El diámetro del FD no afectó la tasa de gestación [rango 8-11 mm: 59,6% (28/47) y rango >11 mm: 58,3% (7/12)] en “vacas sin cría”. Sin embargo, la tasa de gestación tendió a ser mayor ($P=0,08$) en vacas que ovularon después que en vacas que ovularon antes de la IATF (Figura 4).

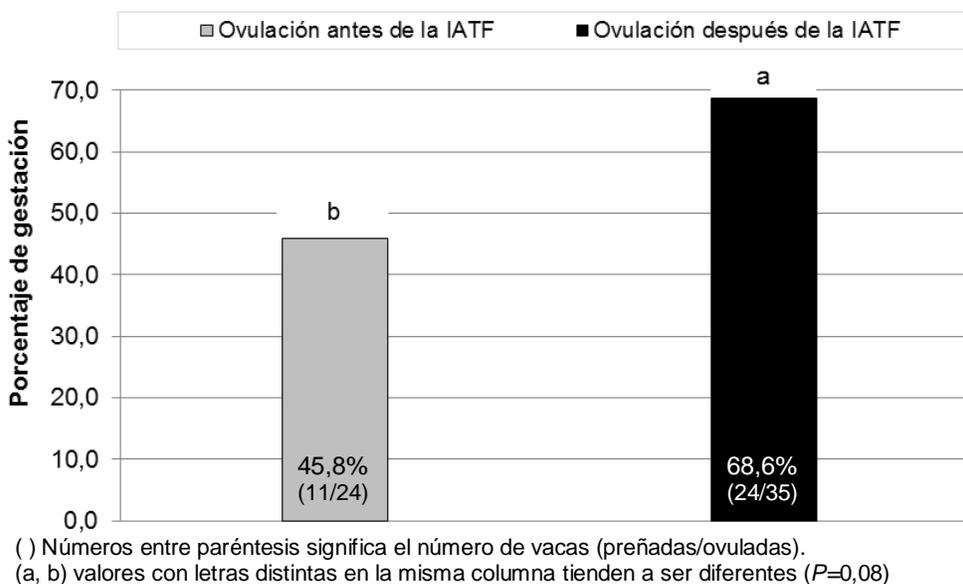


Figura 4: Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) según el momento de ovulación en “vacas sin cría”.

4.1.5. Proporción del sexo de las crías

La proporción del sexo de las crías ($n=30$) no fue diferente ($P=0,692$) entre los tratamientos.

El 63,3 % (19/30) de las vacas que lograron el parto ovularon en el ovario derecho. La proporción del sexo de las crías no fue diferente ($P=0,453$) en vacas que ovularon en el ovario izquierdo que en vacas que ovularon en el ovario derecho (Cuadro 3).

Cuadro 3: Proporción de terneros macho según el ovario donde ocurrió la ovulación en “vacas *sin cría*”.

Ovario	Terneros macho/total de las crías (%)
Derecho (n=19)	7/19 (36,8)
Izquierdo (n=11)	6/11 (54,5)
Total (n=30)	13/30 (43,3)

Por otro lado, la proporción del sexo de las crías (n=21) no fue afectada ($P>0,10$) por el MOV (Cuadro 4).

Cuadro 4: Proporción de terneros macho según el momento de ovulación (MOV) respecto de la IATF en “vacas *sin cría*”.

MOV	Terneros macho/total de las crías (%)
Antes de la IATF (n=5)	2/5 (40)
Después de la IATF (n=16)	7/16 (43,8)
Total (n=21)	9/21 (42,9)

4.2. Experimento 2: “Vacas con cría”

4.2.1. Condición corporal e intervalo parto-tratamiento

No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre tratamientos en la condición corporal ni en el intervalo parto-tratamiento hormonal al inicio del experimento en vacas que ovularon (Cuadro 5).

Cuadro 5: Condición corporal (CC) e intervalo parto-tratamiento hormonal (IPT) al inicio del experimento en “vacas con cría” que ovularon.

Variable	Tratamiento				P-valor
	1	2	3	4	
n= 177	47	45	43	42	-
CC (media±EEM)	3,9±0,1	3,9±0,2	3,8±0,1	4,0±0,1	0,624
IPT (promedio±EEM)	62,8±2,2	63,3±2,4	62,4±2,4	63,2±2,6	0,991

Tratamiento: T1 (Control): IA en el cuerpo del útero con una DCE; T2: IA en el cuerpo del útero con una DRE; T3: IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE y T4: doble IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE.

4.2.2. Diámetro del folículo dominante y proporción de animales que ovularon según el momento de ovulación

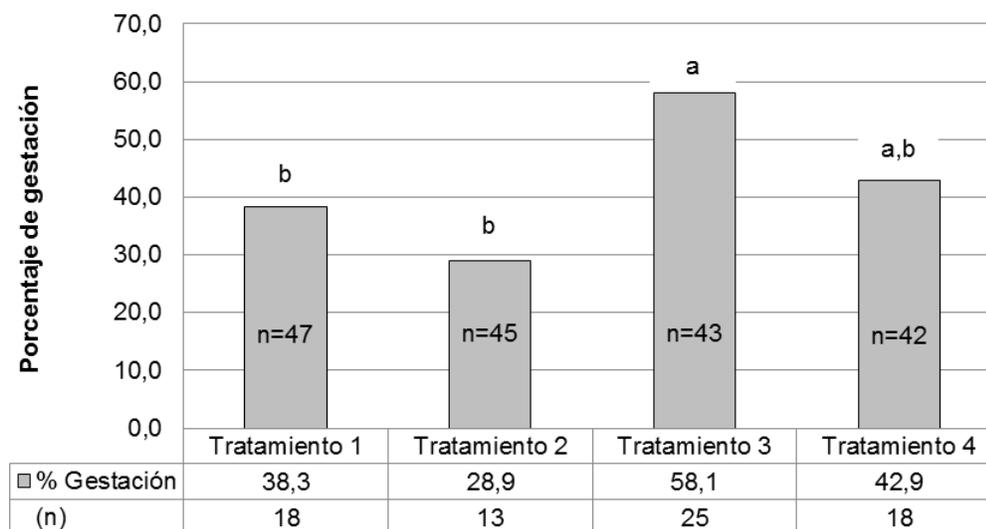
Del análisis adicional (n=106) resultó que el diámetro promedio del FD a las 24 hs después de retirado el DIB fue de 11,1±0,2 mm (±EEM) y fue mayor ($P<0,05$) en vacas que ovularon antes que en vacas que ovularon después de la IATF. De manera opuesta, la proporción de animales que ovularon fue mayor ($P<0,05$) en vacas que ovularon después respecto de las que ovularon antes de la IATF (Cuadro 6).

Cuadro 6: Diámetro del folículo dominante (FD; mm) a las 24 hs de retirado el DIB y proporción (%) de animales que ovularon según el momento de ovulación en “vacas con cría”.

Variable	Momento de ovulación		P-valor
	Antes de la IATF	Después de la IATF	
Diámetro FD (Promedio±EEM)	11,9±0,4	10,8±0,2	0,007
Proporción de vacas que ovularon (n)	31,1 (33/106)	68,9 (73/106)	<0,001

4.2.3. Tasa de gestación según el tratamiento

La TG en el total de vacas (n=177) sólo fue afectada ($P=0,05$) por el tratamiento. La TG del T4 fue similar ($P>0,05$) a la TG de los demás tratamientos, mientras que la TG del T3 fue mayor ($P<0,05$) que la TG del T1 (control) y T2 (Figura 5).

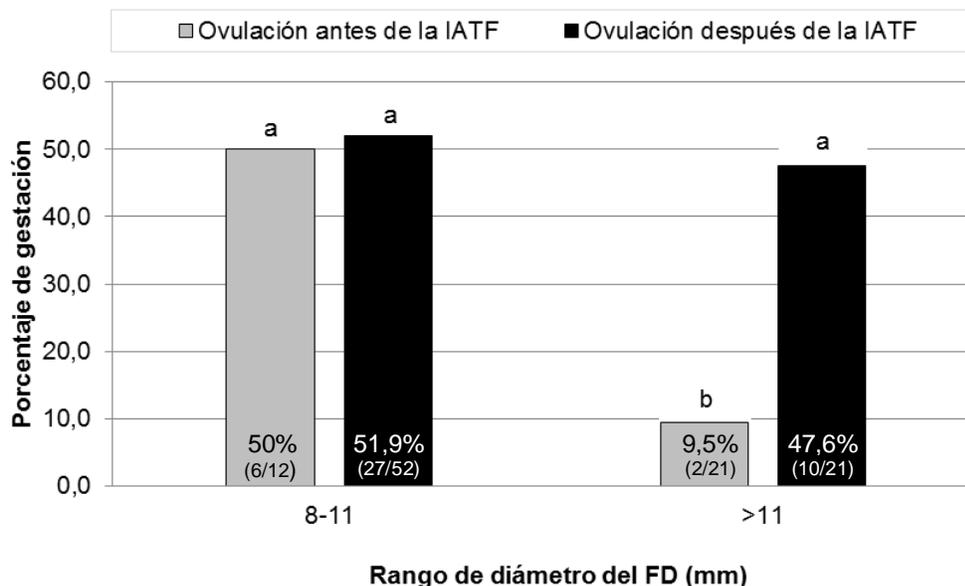


(a, b) valores con letras distintas en las columnas difieren significativamente, $P<0,05$.

Figura 5: Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) para los diferentes tratamientos [T1 (Control): IA en el cuerpo del útero con una DCE; T2: IA en el cuerpo del útero con una DRE; T3: IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE y T4: doble IA en el cuerno uterino ipsilateral al FD con una DRE] en “vacas con cría”.

4.2.4. Tasa de gestación según el diámetro del FD al proestro y el momento de ovulación

La TG (n=106) fue afectada ($P=0,05$) por la interacción entre el diámetro del FD y el MOV en “vacas con cría” (Figura 6).



() Números entre paréntesis significa el número de vacas (preñadas/ovuladas).
Hubo efecto de la interacción entre el diámetro del FD y el MOV, $P=0,05$.

Figura 6: Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) según el diámetro del foliculo dominante (FD) medido a las 24 hs de retirado el DIB y el momento de ovulación (MOV) en “vacas con cría”.

4.2.5. Proporción del sexo de las crías

La proporción del sexo de las crías (n=66) no fue diferente ($P>0,10$) entre las EEAs y entre los tratamientos.

El 65,2 % (43/66) de las vacas que lograron el parto ovularon en el ovario derecho. La proporción del sexo de las crías no fue diferente ($P=0,611$) en vacas que ovularon en el ovario izquierdo que en vacas que ovularon en el ovario derecho (Cuadro 7).

Cuadro 7: Proporción de terneros macho según el ovario donde ocurrió la ovulación en “vacas con cría”.

Ovario	Terneros macho/total de las crías (%)
Derecho (n=43)	22/43 (51,2)
Izquierdo (n=23)	10/23 (43,5)
Total (n=66)	32/66 (48,5)

Por otro lado, la proporción de terneros macho sobre el total de las crías (n=33) tendió a ser mayor ($P=0,07$) en vacas que ovularon después de la IATF (Cuadro 8).

Cuadro 8: Proporción de terneros macho según el momento de ovulación (MOV) respecto de la IATF en “vacas con cría”.

MOV	Terneros macho/total de las crías (%)
Antes de la IATF (n=6)	1/6 (16,7) b
Después de la IATF (n=27)	17/27 (63) a
Total (n=33)	18/33 (54,5)

(a, b) valores con letras distintas en la misma columna tienden a ser diferentes ($P=0,07$).

5. DISCUSION

5.1. Diámetro del folículo dominante y proporción de animales que ovularon según el momento de ovulación

A pesar que el objetivo de este trabajo no fue comparar las diferentes variables entre vacas con y sin cría debido a que son fisiológicamente diferentes, se observó que el diámetro promedio del FD a las 24 hs de retirado el dispositivo en animales que ovularon fue de 9,9 y 11,1 mm en “vacas sin cría” (Exp. 1) y “vacas con cría” (Exp. 2), respectivamente. Esta diferencia (1,2 mm) del diámetro folicular podría deberse a que vacas en lactancia tendría menor concentración sérica de progesterona (Sangsrivong *et al.*, 2002), en consecuencia, mayor liberación de LH y mayor crecimiento folicular que en vacas sin cría. También podría deberse a la duración del tratamiento con progesterona (Exp. 1= 7 días y Exp. 2= 8 días). Manes *et al.* (2012) encontraron en vacas en anestro que el diámetro del FD fue menor cuando el tratamiento con progesterona tuvo una duración de 7 días comparado con una duración de 8 ó 9 días. Por otro lado, los animales del experimento 2 recibieron una dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) que podría aumentar el tamaño folicular respecto del experimento 1. Varios trabajos (Yavas; Walton, 2000; Baruselli *et al.*, 2009; Sá Filho *et al.*, 2010b) informaron que la aplicación de una dosis de eCG después de finalizado un tratamiento con progesterona produce un aumento del diámetro del folículo dominante.

De todas maneras, si consideramos una tasa de crecimiento diario de 1,2 mm/día (Ginther *et al.*, 1989) del folículo dominante desde el proestro hasta la ovulación, los resultados de ambos experimentos son coincidentes con los obtenidos por otros autores (Gimenez *et al.*, 2005; Sá Filho *et al.*, 2010a), quienes establecieron que existe un tamaño óptimo del folículo preovulatorio para que la tasa de ovulación sea cercana al 100%.

Durante el crecimiento folicular y desarrollo de los ovocitos se producen y almacenan ARNm y proteínas (Brevini-Gandolfi y Gandolfi, 2001) y a medida que aumenta el tamaño del folículo y del ovocito, se adquiere una mayor competencia para la ovulación. El diámetro promedio del FD a las 24 hs de retirado el DIB en “vacas sin cría” (Exp. 1) fue similar entre los animales que ovularon antes ($10,3 \pm 0,5$ mm) y después ($9,6 \pm 0,3$ mm) de la IATF. Sin embargo, en “vacas con cría” (Exp. 2) fue

significativamente diferente (ovulación pre-IATF=11,9±0,4 mm y pos-IATF: 10,8±0,2 mm).

Probablemente esta diferencia se deba al momento de la emergencia de la nueva onda folicular luego de la aplicación del dispositivo intravaginal y la inyección del benzoato de estradiol. Ginther *et al.* (1989) definió a la emergencia natural de una onda folicular como la aparición espontánea de un grupo de folículos antrales entre 4 y 5 mm de diámetro. La utilización de un tratamiento con progesterona y estrógeno suprime el crecimiento folicular y consecuentemente permite la aparición sincrónica de una nueva onda folicular aproximadamente 4 días después de la aplicación del estrógeno con una variación de 3 a 6 días. Esta variación es influenciada por la fase de desarrollo folicular y el estado endocrino del animal al inicio del tratamiento (Bó *et al.*, 1995). De manera que, un FD de mayor diámetro al proestro podría provenir de una onda folicular que emergió más temprano que una onda de la cual proviene un FD de menor diámetro. Por otro lado, poco antes de la dominancia folicular, el futuro FD presenta una mayor expresión de receptores para LH y mayor capacidad de crecimiento que los futuros folículos subordinados (Beg *et al.*, 2002). En consecuencia, previo a la ovulación el FD alcanza la capacidad de responder al pico preovulatorio de la LH (capacidad ovulatoria) que es adquirida cuando un folículo preovulatorio alcanza un diámetro de 10 mm (Sartori *et al.*, 2001). Por lo tanto, un FD de mayor diámetro tiene más probabilidad de ovular antes que un FD de menor diámetro, quien requeriría más tiempo para alcanzar un tamaño óptimo de ovulación.

La ovulación adquiere una importancia preponderante para el éxito reproductivo en los mamíferos. Por lo tanto, los tratamientos de sincronización e inducción de celo/ovulación para IATF persiguen el objetivo de obtener una alta tasa de ovulación y que la mayoría de las ovulaciones se produzcan en un rango reducido de tiempo para asegurar una alta tasa de concepción y gestación.

La proporción de animales que ovularon antes o después de la IATF no fue diferente en el experimento 1, probablemente debido a que el número de animales utilizados no fue suficiente para detectar una diferencia. En cambio, en el experimento 2 la proporción de animales que ovuló después de la IATF fue mayor que la proporción de animales que ovuló antes de la IATF. Estos resultados son similares a trabajos previos (Pincinato *et al.*, 2005; Baruselli *et al.*, 2009; Sales *et al.*, 2011) donde se observó que la mayoría de las ovulaciones se produjeron después de las 54 hs de retirado el dispositivo intravaginal en animales que fueron tratados con un protocolo de

sincronización e inducción del celo/ovulación basado en progesterona y benzoato de estradiol.

5.2. Tasa de gestación según el tratamiento

La inseminación artificial intracornual profunda se basa en el concepto de que la deposición de espermatozoides lo más cercana posible a la unión útero-tubárica aumentaría el número de espermatozoides potencialmente fertilizantes en el reservorio espermático funcional del oviducto -istmo caudal- (Hunter; Greve, 1997).

En el experimento en “vacas sin cría” (Exp. 1) y en el experimento en “vacas con cría” (Exp. 2) cuando se analizaron los datos de 106 animales, no se observaron diferencias en la tasa de gestación entre los tratamientos, lo que podría indicar que el número de animales utilizados por tratamiento (Exp. 1: n=13 a 17 y Exp. 2: n=25 a 28) no fue suficiente para detectarla. Sin embargo, en el experimento 2 los resultados obtenidos con el total de animales (n=177) demuestran que una IATF realizada en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con folículo dominante, combinada con un bajo número de espermatozoides (T3) mejora la tasa de gestación comparada con una IATF realizada en el cuerpo del útero con una dosis reducida o convencional de espermatozoides. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Senger *et al.*, 1988; López-Gatius; Camón-Urgel, 1988), donde la deposición seminal intracornual profunda resultó en una tasa de gestación mayor que la deposición en el cuerpo uterino. Otro estudio demostró que la inseminación intracornual con 2 ó 40 millones de espermatozoides por dosis fue más eficaz que una inseminación convencional (deposición en el cuerpo del útero de 40 millones de espermatozoides) (Kurykin *et al.*, 2003). Una posible explicación de los resultados observados en el presente trabajo, podría ser que el número de espermatozoides se reduciría sustancialmente cuando son depositados en el cuerpo del útero debido a que gran parte de los espermatozoides podrían perderse por el movimiento retrógrado hacia la vagina (Hawk; Tanabe, 1986; Mitchell *et al.*, 1985; Gallagher; Senger, 1989). No obstante, existen trabajos en los que no se han observado diferencias ni en la tasa de fecundación (Hawk; Tanabe, 1986) ni en la tasa de gestación (Momont *et al.*, 1989) al comparar ambos sitios de deposición. Esto no ocurriría cuando la deposición es realizada cerca de la unión utero-tubárica. Por otro lado, en el presente estudio, la tasa de gestación de la IATF en el cuerpo del útero con una dosis reducida (5 millones de

espermatozoides) tendió a ser inferior a la obtenida con una dosis de 25 millones de espermatozoides. Anderson *et al.* (2004) concluyeron que, una dosis de 2 millones de espermatozoides congelados-descongelados podría ser demasiado baja en la mayoría de los toros para obtener aceptables tasas de gestación y probablemente en nuestro trabajo una dosis de 5 millones de espermatozoides haya sido insuficiente para los toros utilizados.

En el presente trabajo, la doble IATF (T4) no mejoró la tasa de gestación comparada con una IATF. Este resultado coincide con el obtenido por Kurykin *et al.* (2003), donde la tasa de gestación fue similar entre una IATF (80-82 hs) y dos IATF (72 y 96 hs) después de aplicar un protocolo para sincronización de celos con doble dosis de PGF2 α . De modo similar, en otro trabajo, donde se utilizó GnRH y doble IA en vacas Holstein que presentaron estro espontáneo, tampoco se encontraron diferencias en las tasas de gestación entre una y dos IA (Stevenson *et al.*, 1990). Se podría hipotetizar que, la doble IATF intracornual profunda produzca una mayor lesión y/o contaminación del endometrio que afectaría el transporte espermático y la viabilidad embrionaria, lo que no sería una ventaja para mejorar la eficiencia de un programa de IATF. Sin embargo, Williams *et al.* (1987) sugirieron que la IA intracornual profunda no produce lesiones ni contaminación bacteriana en el endometrio. Por otro lado, en el presente estudio la segunda inseminación podría no haber causado efecto sobre la tasa de gestación por realizarse demasiado tarde respecto a la ovulación (Dalton *et al.*, 2001).

5.3. Tasa de gestación según el diámetro del FD al proestro y el momento de ovulación

En el experimento 1 (vacas sin cría) la TG tendió a ser mayor en vacas que ovularon después que en vacas que ovularon antes de la IATF. Mientras que, en el experimento 2, las vacas con un FD >11 mm y que ovularon antes de la IATF presentaron una TG menor que las vacas que ovularon después de la IATF y que las vacas que presentaron un FD de 8-11 mm, independientemente del momento de ovulación.

Como fue mencionado anteriormente, el tamaño del FD al proestro afectó el momento de la ovulación, es decir que el intervalo entre el inicio del proestro (inyección de prostaglandina) y la ovulación en animales con FD de mayor diámetro

fue menor que el intervalo en animales con FD de menor tamaño. Esto es particularmente importante porque la tasa de gestación en vacas para carne aumentó cuando el proestro fue más largo, debido a que los animales estuvieron expuestos a mayor concentración de estradiol y por un período más prolongado. La producción del estradiol durante el proestro tiene efectos positivos sobre el desarrollo de un CL competente y sobre las células uterinas para la supervivencia del embrión (Bridges *et al.*, 2010).

Respecto a la tasa de gestación según el intervalo IA-ovulación, varios trabajos fueron realizados para determinar el momento óptimo de la IA en bovinos para leche. En general, todos coinciden que la IA debe realizarse entre 12 y 24 hs de iniciado el estro, es decir antes que ocurra la ovulación. Ejemplo de estos trabajos es un estudio realizado por Dransfield *et al.* (1998), quienes luego de la detección de celo natural espontáneo mediante el sistema electrónico Heat Watch®, obtuvieron una mayor tasa de gestación cuando la inseminación se realizó entre 4 y 16 hs después del inicio del estro que cuando se realizó por fuera de dicho período. Otro ejemplo, es un trabajo de campo realizado en vaquillonas que fueron inseminadas entre las 0 y 13 hs después de iniciado el estro natural y presentaron una mejor tasa de concepción (60%) que cuando fueron inseminadas entre 13,5 y 33 hs posteriores al inicio del estro -40% (Rankin *et al.*, 1992). Probablemente, la IATF realizada posterior a la ovulación llevaría a una asincronía (retraso) entre la llegada de los espermatozoides con capacidad fertilizante y la maduración del ovocito como preparación a la fecundación. En el presente trabajo, la asincronía podría observarse en animales con un FD de mayor tamaño que ovularon antes de la IATF y que presentaron una tasa de gestación menor que el resto de los animales (Exp. 2).

Una posible explicación de que la tasa de gestación es mayor en animales que ovulan después (inseminación realizada antes de la ovulación) que en animales que ovulan antes de la IATF, es que los espermatozoides con capacidad fertilizante requieren hasta 12 hs para realizar su recorrido desde el cuerpo del útero hasta el sitio de fertilización (Scott, 2000). En un experimento llevado a cabo en vaquillonas con estro inducido con doble dosis de un análogo de prostaglandina y con servicio con toros, se determinó que la tasa de fertilización (ovocitos fertilizados/ovocitos recolectados en el oviducto) a las 6, 8, 10 ó 12 hs posteriores al servicio fue de 9, 40, 42 y 70 % respectivamente. Por lo tanto, los autores sugirieron que la población de espermatozoides potencialmente fertilizante comenzaría a estar presente luego de 6 hs de la deposición del semen. De manera que, durante la fase lenta de transporte

espermático, los espermatozoides con capacidad fertilizante atraviesan la unión utero-tubárica y se acumulan en el istmo caudal del oviducto y permanecen allí hasta la ovulación (Wilmot; Hunter, 1984).

Por otro lado, varios autores (Vandemark; Moeller, 1951; Wilmot; Hunter, 1984) informaron que inmediatamente después de la deposición natural del semen en la vagina, un pequeño número de espermatozoides, son impulsados hacia el oviducto por las contracciones del útero y el movimiento de los fluidos y llegan rápidamente al lugar de fertilización. Por lo tanto, un ovocito ovulado antes de la inseminación artificial, podría ser fertilizado por los espermatozoides que entran al oviducto durante la fase inicial de transporte (fase rápida). Sin embargo, otro estudio realizado en conejas, reveló que la mayoría de los espermatozoides que llegan primero a la ampolla del oviducto, son inmóviles y presentan la membrana plasmática dañada (Overstreet; Cooper, 1978).

Varios trabajos (Brackett *et al.*, 1980; Larson *et al.*, 2010) indicaron que la viabilidad del ovocito en el tracto genital femenino disminuye 10 hs después de la ovulación. Por lo tanto, podría ser otro factor que disminuiría la tasa de gestación en animales que ovulan antes de la IATF respecto de los que ovulan después. Probablemente se deba a que una inseminación tardía aumenta la tasa de embriones de mala calidad debido al envejecimiento del ovocito (Dalton *et al.*, 2001).

En síntesis, la tasa de gestación en vacas con FD al proestro mayor a 11 mm que ovularon antes de la IATF podría estar comprometida por no suceder la fecundación, o en caso contrario, generarse embriones de baja viabilidad y/o no tener las condiciones endocrinas y uterinas adecuadas para la supervivencia.

5.4. Proporción del sexo de las crías

Hylan *et al.* (2009) realizaron un trabajo con varios experimentos y encontraron una mayor proporción de terneros macho cuando la gestación se produjo en el cuerno uterino derecho sobre la base de terneros/as nacidos vivos en vacas que recibieron servicio con toros. Pero, cuando evaluaron los datos de 521 terneros/as nacidos vivos provenientes de transferencias embrionarias no encontraron diferencias en la proporción de terneros macho gestados en el cuerno uterino izquierdo o derecho. Por lo tanto, el cuerno uterino derecho o izquierdo no proporcionaría un entorno preferencial para embriones macho o hembra. Por otro lado, la mayoría de los

embriones obtenidos de vacas superovuladas y por fertilización *in vitro* de ovocitos obtenidos del ovario izquierdo fueron de sexo femenino. Sin embargo, la proporción de embriones macho y hembra fue similar a partir de ovocitos obtenidos del ovario derecho. Por lo tanto, estos autores concluyeron que, la mayor proporción de terneros macho observada en el cuerno uterino derecho probablemente se debería al ovocito que le dio origen.

En el presente trabajo se observó que el 63 % de las “vacas sin cría” (Exp. 1) y el 65 % de las “vacas con cría” (Exp. 2) que lograron el parto, ovularon en el ovario derecho. En ambos experimentos, la proporción de terneros macho no difirió entre vacas que ovularon en el ovario izquierdo y las que ovularon en el ovario derecho. Probablemente el número de animales utilizados fue escaso para detectar alguna diferencia estadística.

Por otro lado, existen evidencias de que el sexo de las crías podría estar afectado por el lugar de deposición del semen en el útero cuando se realiza una IA (Zobel *et al.*, 2011) y por el momento de la IA después de la detección del celo (Martínez *et al.*, 2004). Actualmente se desconoce la fisiología que explicaría estos efectos, pero podría deberse a la diferencia de la motilidad espermática (Goodall; Roberts, 1976), del tiempo de supervivencia (Rohde *et al.*, 1973) y de capacitación (Wehner *et al.*, 1997) entre espermatozoides con cromosomas X e Y en el tracto reproductor femenino.

En el presente trabajo, no se observaron diferencias en la proporción del sexo de las crías entre tratamientos, por lo tanto no hubo efecto del lugar de deposición del semen ni del número de espermatozoides. Sin embargo, Zobel *et al.* (2011), quienes trabajaron con una mayor cantidad de animales comparada con la cantidad de animales utilizados en el presente trabajo, obtuvieron un 20% más de terneros macho en vacas inseminadas en el cuerpo uterino que en vacas inseminadas en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con folículo dominante.

Por otro lado, el momento de la ovulación, en el experimento 1, no afectó la proporción del sexo de las crías. Mientras que, en el experimento 2, la proporción de terneros macho tendió a ser mayor en vacas que ovularon después de la IATF que en vacas que ovularon antes de la IATF.

Martínez *et al.* (2004), observaron que la proporción de terneros macho fue mayor cuando la IA fue realizada entre 30 y 44 hs (poco antes o después de la ovulación) que cuando fue realizada entre 8 y 30 hs desde el inicio del estro. Mientras que, Wehner *et al.* (1997), quienes utilizaron un dispositivo electrónico que mide la conductividad del

moco cervical para determinar el estado del ciclo estral en vacas, obtuvieron un porcentaje de 92% de terneros macho cuando la IA se realizó 10 hs antes de la ovulación y un 7% cuando la IA se realizó 20 hs antes de la ovulación. Sin embargo, Rorie (1999) no encontró diferencias en la proporción del sexo de las crías cuando la IA se realizó entre 8 y 10 hs o entre 20 y 25 hs desde el inicio del estro. De modo similar, en otro trabajo la proporción del sexo de embriones bovinos a los siete días de edad no difirió entre los intervalos entre la IA y la ovulación (Roelofs *et al.*, 2006).

Se ha informado, que el transporte de espermatozoides con cromosoma Y es más rápido que el de espermatozoides con cromosoma X a través del moco cervical (Rohde *et al.*, 1973). Probablemente esto suceda en otro lugar de tracto reproductor femenino. Por lo tanto, en el presente trabajo la mayor proporción de terneros macho en vacas que ovularon después respecto de las que ovularon antes de la IATF podría deberse, por un lado, a que los espermatozoides con cromosoma Y lograrían la capacitación en el istmo del oviducto, la liberación del epitelio oviductal y la llegada al lugar de fertilización antes que los espermatozoides con cromosoma X. Por otro lado, también podría influir que la ovulación, después de un tratamiento de sincronización/inducción con progestágeno/estrógeno, se produce en promedio 10 hs después de la IATF (Vittone *et al.*, 2011). Sin embargo, este supuesto es contradictorio en vacas que ovularon antes de la IATF, pero en este caso la proporción del sexo de las crías pudo estar afectada por fallas en la fecundación y/o muertes embrionarias, como fue explicado anteriormente, donde la tasa de gestación fue menor en vacas que ovularon antes que en vacas que ovularon después de la IATF.

6. CONCLUSIÓN

- Una IATF con una dosis reducida de espermatozoides depositados en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con folículo dominante aumenta la tasa de gestación respecto a la obtenida con una IATF convencional.
- Dos IATF con dosis reducida de espermatozoides en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con folículo dominante no aumenta la tasa de gestación respecto a la obtenida con una IATF convencional.
- La tasa de gestación disminuye cuando la IATF es realizada posterior a la ovulación.
- La proporción de terneros macho sobre el total de las crías podría ser mayor en vacas que ovulan después comparada con vacas que ovulan antes de la IATF.

7. IMPLICANCIAS

La utilización de la IATF realizada en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con FD podría tener algunas implicancias prácticas que deben ser consideradas. La determinación de la presencia y la ubicación del FD por palpación rectal o ecografía en el día previo a la IATF es un trabajo adicional y podría ser causa de mayor estrés en los animales. Asimismo, la metodología implica el re-entrenamiento de profesionales y probablemente se pueda inseminar un menor número de animales por día que cuando se realiza una IATF convencional sin esa práctica ecográfica.

Por otro lado, más experimentos serán necesarios para estudiar el efecto de la doble IATF combinada con dosis reducida de espermatozoides y realizadas en diferentes momentos después del tratamiento hormonal. Además, el diámetro del FD al proestro podría ser considerado para decidir el momento de una IATF. Por lo tanto, deberían realizarse estudios tendientes a evaluar si las vacas con un FD con mayor diámetro en el día previo a la IATF mejoran la fertilidad cuando son inseminadas 6 a 8 horas antes respecto al intervalo convencional (54-56 hs). Estos estudios podrían ser importantes para aumentar la eficiencia de la IATF cuando se utiliza una dosis reducida de espermatozoides provenientes de semen no sexado o sexado.

. 8. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 94: 177-188.
- ALBERIO, R.H.; BUTLER, H.; SCHIERSMANN, G.; TORQUATI, O. 1986. Efecto de la progesterona intravaginal combinada con un destete temporario o PMSG en vacas de cría. *Revista Argentina de Producción Animal*. 6: 81-86.
- ALLRICH, R.D. 1994. Endocrine and neural control of estrus dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 77: 2738-2744.
- ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOSKINEN, E.; DAHLBOM, M. 2004. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*. 61: 1583-1588.
- ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 2: 139-146.
- AVILÉS, M.; CUTAIA, L.; PERES, L.C.; PINCINATO, D.; MARAÑA PEÑA, D.; BALLA, E.; VIDELA DORNA, I.; BÓ, G.A. 2005. Efecto del uso de DIB® (0,5 g ó 1 g de progesterona) sobre el momento de inicio de onda y ovulación en vacas y vaquillonas tratadas con benzoato de estradiol. 6to Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. p. 383.
- BAHAT, A.; GAKAMSKY, A.; TUR-KASPA, I.; GIOJALAS, L.C.; EISENBACH, M. 2003. Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nature Medicine*. 9(2): 149-150.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.-F.; CORMIER, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 21(1): 1-7.
- BAKER, T.G. 1982. Oogenesis and ovulation. In: Austin, C.R.; Short, R.V. (eds.). *Reproduction in mammals*. University Cambridge Press, London, Great Britain. pp.38-44.
- BARTH, A.D. 1995. Bull breeding soundness evaluation. (eds.). Western Canadian Association of Bovine Practitioners, Department Herd Medicine and Theriogenology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá. pp.75.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; BÓ, G.A. 2003. Tratamientos hormonales para mejorar la performance reproductiva de vacas de cria en anestro em condiciones tropicales. 5to Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina pp. 103-116. CD
- BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; SÁ FILHO, M.F. 2009. Uso de la eCG en biotecnologías reproductivas en bovinos. 8vo Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina. CD

- BATTALIA, D.E.; YANAGIMACHI, R. 1979. Enhanced and co-ordinated movement of the hamster oviduct during the periovulatory period. *Journal of Reproduction and Fertility*. 57: 515-520.
- BEAN, B.H.; PICKETT, B.W.; MARTIG, R.C. 1963. Influence of freezing methods, extenders and storage temperatures on motility and pH of frozen bovine semen. *Journal Dairy Science*. 46(2): 145-149.
- BEDFORD, J.M. 1974. Maturation of the fertilizing ability of mammalian spermatozoa in the male and female reproductive tract. *Biology of Reproducción*. 11: 346-362.
- BEDFORD, J.M.; SHALKOVSKY, R. 1967. Species-specificity of sperm capacitation in the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 13: 361-364.
- BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. 2002. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproducción*. 66: 120-126.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*. 39(3): 193-204.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*. 78: 307-326.
- BOUISSOU, M.-F. 1978. Effect of injections of testosterone propionate on dominance relationships in a group of cows. *Hormones and Behavior*. 11(3): 388-400.
- BRACKETT, B.G.; OH, Y.K.; EVANS, J.F.; DONAWICK, W.J. 1980. Fertilization and early development of cow ova. *Biology of Reproducción*. 23: 189-205.
- BREVINI GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. 2001. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development *Theriogenology*. 55: 1255-1276.
- BRIDGES, G.A.; MUSSARD, M.L.; BURKE, C.R.; DAY, M.L. 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Animal Reproduction Science*. 117: 208-215.
- BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B.C.; CARON, P.J.; EPPIG, J.J. 1990. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Developmental Biology*. 138: 16-25.
- CABIA. 2013. Movimiento anual de dosis de semen. [en línea] <http://181.119.20.20/cabia/Plantilla_Estadisticas_CABIA_2011.pdf> [consulta: 10 junio 2013.]
- CLARK, M.M.; GALEF, B.G.J.; VOM SAAL, F.S. 1991. Nonrandom sex composition of gerbil, mouse, and hamster litters before and after birth. *Developmental Psychobiology*. 24(2): 81-90.

- COHEN-DAYAG, A.; TUR-KASPA, I.; DOR, J.; MASHIACH, S.; EISENBACH, M. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 11039-11043.
- CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.-Y.; SU, Y.-Q. 2006. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinology*. 20: 715-723.
- CROKER, K.P.; SHELTON, J.N. 1973. Influence of stage of cycle, progestagen treatment and dose of oestrogen on uterine motility in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*. 32: 521-524.
- CUTAIA, L.; VENERANDA, G.; TRÍBULO, R.; BARUSELLI, P.S.; BÓ, G.A. 2003. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. 5to Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina pp. 119-132. CD
- CHRISTENSEN, D.S.; HOPWOOD, M.L.; WILTBANK, J.N. 1974. Levels of hormones in the serum of cycling beef cows. *Journal of Animal Science*. 38: 577-583.
- DALTON, J.C.; AHMADZADEH, A.; SHAFII, B.; PRICE, W.J.; DEJARNETTE, J.M. 2004. Effect of simultaneous thawing of multiple 0.5-mL straws of semen and sequence of insemination on conception rate in dairy cattle. *Journal Dairy Science*. 87: 972-975
- DALTON, J.C.; NADIR, S.; BAME, J.H.; NOFTSINGER, M.; NEBEL, R.L.; SAACKE, R.G. 2001. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 84: 2413-2418.
- DALTON, J.D. 2013. Características del semen de relevancia para la inseminación artificial a tiempo fijo. 10no Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina pp. 183-198. CD
- DEJARNETTE, J.M.; SAACKE, R.G.; BAME, J.; VOGLER, C.J. 1992. Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *Journal Animal Science*. 70: 484-491.
- DOBROWOLSKI, W.; HAFEZ, E.S.E. 1970. Transport and distribution of spermatozoa in the reproductive tract of the cow. *Journal of Animal Science*. 31: 940-943.
- DOMINKO, T.; FIRST, N.L. 1997. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. *Theriogenology*. 47: 1041-1050.
- DRANSFIELD, M.B.G.; NEBEL, R.L.; PEARSON, R.E.; WARNICK, L.D. 1998. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *Journal of Dairy Science*. 81: 1874-1882.
- DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal of Experimental Zoology*. 265: 432-437.

- DUGGAVATHI, R.; MURPHY, B.D. 2009. Ovulation signals. *Science*. 324: 890-891.
- DZIUK, P.J.; BEUOWS, R.A. 1983. Management of reproduction of beef cattle, sheep and pigs. *Journal of Animal Science*. 57: 355-379.
- EDSON, M.A.; NAGARAJA, A.K.; MATZUK, M.M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*. 30(6): 624-712.
- EISENBACH, M. 1999. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Developmental Genetics*. 25: 87-94.
- ELLINGTON, J.E.; SAMPER, J.C.; JONES, A.E.; OLIVER, S.A.; BURNETT, K.M.; WRIGHT, R.W. 1999. In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. *Animal Reproduction Science*. 56: 51-65.
- EPPIG, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 122: 829-838.
- ERICKSON, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*. 25: 800-805.
- ESPEY, L.L. 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproducción*. 50: 233-238.
- FABRO, G.; ROVASIO, R.A.; CIVALERO, S.; FRENKEL, A.; CAPLAN, R.; EISENBACH, M.; GIOJALAS, L.C. 2002. Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biology of Reproducción*. 67: 1565-1571.
- FAZELI, A.; DUNCAN, A.E.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and referential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species *Biology of Reproducción*. 60: 879-886.
- FIKE, K.E.; DAY, M.L.; INSKEEP, E.K.; KINDER, J.E.; LEWIS, P.E.; SHORT, R.E.; HAFS, H.D. 1997. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrus when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. *Journal of Animal Science*. 75: 2009-2015.
- FOOTE, R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 80: 1-10.
- GADDUM-ROSE, P. 1981. Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat. *The American Journal of Anatomy*. 160: 333-341.
- GALLAGHER, G.R.; SENGER, P.L. 1989. Concentrations of spermatozoa in the vagina of heifers after deposition of semen in the uterine horns, uterine body or cervix. *Journal of Reproduction and Fertility*. 86: 19-25.
- GARNER, D.L. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*. 65: 943-957.

- GEORGIU, A.S.; SNIJDERS, A.P.L.; SOSTARIC, E.; AFLATOONIAN, R.; VAZQUEZ, J.L.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A.; WRIGHT, P.C.; FAZELI, A. 2007. Modulation of the oviductal environment by gametes. *Journal of Proteome Research*. 6(12): 4656-4666.
- GIMENEZ, L.U.; SA FILHO, M.F.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M.; BARUSELLI, P.S. 2005. Estudio ultrasonografico de la divergencia folicular en vaquillas Nelore (*Bos indicus*). *Acta Scientia Veterinaria*. p. 210.
- GINTHER, O.J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 61-79.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*. 78: 239-257.
- GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science*. 20(3): 187-200.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*. 48: 75-87.
- GIOJALAS, L.; ROVASIO, R. 1998. Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *International Journal of Andrology*. 21: 201-206.
- GOODALL, H.; ROBERTS, A.M. 1976. Differences in motility of human X- and Y-bearing spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48: 433-436.
- GRANT, V.J. 1994. Maternal dominance and the conception of sons. *British Journal of Medical Psychology*. 67: 343-351.
- GRANT, V.J.; IRWIN, R.J. 2005. Follicular fluid steroid levels and subsequent sex of bovine embryos. *Journal of Experimental Zoology*. 303 A(12): 1120-1125.
- GRANT, V.J.; IRWIN, R.J.; STANDLEY, N.T.; SHELLING, A.N.; CHAMLEY, L.W. 2008. Sex of bovine embryos may be related to mothers' preovulatory follicular testosterone. *Biology of Reproducción*. 78: 812-815.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. 2000a. Ciclos Reproductivos. In: Hafez, E.S.E.; Hafez, B. (eds.). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Mac Graw-Hill Interamericana, México. pp.56-69.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. 2000b. Fecundación y segmentación. In: Hafez, E.S.E.; Hafez, B. (eds.). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Mac Graw-Hill Interamericana, México. pp.113-128.
- HAWK, H.W. 1975. Hormonal control of changes in the direction of uterine contractions in the estrous ewe. *Biology of Reproducción*. 12: 423-430.

- HAWK, H.W. 1983. Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract. *Journal of Dairy Science*. 66: 2645--2660.
- HAWK, H.W.; TANABE, T.Y. 1986. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *Journal of Animal Science*. 63: 551-560.
- HERD, D.B.; SPROTT, L.R. 1996. Body condition, nutrition and reproduction of beef cows. The Texas A&M University System, Texas, EEUU. pp. 1-12.
- HOLT, W.V.; ELLIOTT, R.M.; FAZELI, A.; SOSTARIC, E.; GEORGIU, A.S.; SATAKE, N.; PRATHALINGAM, N.; WATSON, P.F. 2006. Harnessing the biology of the oviduct for the benefit of artificial insemination. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. 62: 247-259.
- HUNTER, R.H.F. 2003. Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle. *Animal Reproduction Science*. 79: 157-170.
- HUNTER, R.H.F.; GREVE, T. 1997. Are lower fertility bulls necessarily less fertile? Proposals concerning insemination procedures. *Animal Reproduction Science*. 48: 113-121.
- HUNTER, R.H.F.; NICHOL, R. 1983. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *The Journal of Experimental Zoology*. 228: 121-128.
- HUNTER, R.H.F.; WILMUT, I. 1984. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reproduction Nutrition Développement*. 24(5A): 597-608.
- HYLAN, D.; GIRALDO, A.M.; CARTER, J.A.; GENTRY JR., G.T.; BONDIOLI, K.R.; GODKE, R.A. 2009. Sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. *Biology of Reproducción*. 81: 933-938.
- IRVING-RODGERS, H.F.; CATANZARITI, K.D.; ASPDEN, W.J.; D'OCCHIO, M.J.; RODGERS, R.J. 2006. Remodeling of extracellular matrix at ovulation of the bovine ovarian follicle. *Molecular Reproduction and Development*. 73: 1292-1302.
- ITO, M.; SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R. 1991. Effect of ovulation on sperm transport in the hamster oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*. 93: 157-163.
- IVANOFF, E.I. 1922. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *The Journal of Agricultural Science*. 12: 244.
- JAISWAL, B.S.; EISENBACH, M.; TUR-KASPA, I. 1999. Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Molecular Human Reproduction*. 5(3): 214-219.
- JIMÉNEZ, L.M.; BINELLI, M.; BERTOLIN, K.; PELLETIER, R.M.; MURPHY, B.D. 2010. Scavenger receptor-B1 and luteal function in mice. *Journal of Lipid Research*. 51: 2362-2371.

- JIN, M.; FUJIWARA, E.; KAKIUCHI, Y.; OKABE, M.; SATOUH, Y.; BABA, S.A.; CHIBA, K.; HIROHASHI, N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Developmental Biology*. 108(12): 1-5.
- JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R. 1999. Sex preselection: High-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*. 52(8): 1323-1341.
- KESNER, J.S.; CONVEY, E.M.; ANDERSON, C.R. 1981. Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology*. 108: 1386-1391.
- KNOPF, L.; KASTELIC, J.P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O.J. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domestic Animal Endocrinology*. 6(2): 111-119.
- KURYKIN, J.; JAAKMA, Ü.; MAJAS, L.; JALAKAS, M.; AIDNIK, M.; WALDMANN, A.; PADRIK, P. 2003. Fixed time deep intracornual insemination of heifers at synchronized estrus. *Theriogenology*. 60: 1261-1268.
- KURYKIN, J.; JAAKMA, Ü.; WALDMANN, A.; JALAKAS, M.; AIDNIK, M.; MAJAS, L.; PADRIK, P. 2006. Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF2 α treatment or at spontaneous estrus. *Animal Reproduction Science*. 95: 116-124.
- LAMB, G.C.; STEVENSON, J.S.; KESLER, D.J.; GARVERICK, H.A.; BROWN, D.R.; SALFEN, B.E. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 α for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *Journal of Animal Science*. 79: 2253-2259.
- LARSON, J.E.; LAMB, G.C.; FUNNELL, B.J.; BIRD, S.; MARTINS, A.; RODGERS, J.C. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 73(5): 698-703.
- LARSSON, B. 1987. Determination of Ovulation by Ultrasound Examination and its Relation to the LH-Peak in Heifers. *Journal of Veterinary Medicine*. 34(1-10): 749-754.
- LÓPEZ-GATIUS, F. 2000. Site of semen deposition in cattle: a review. *Theriogenology*. 53: 1407-1414.
- LÓPEZ-GATIUS, F.; CAMÓN-URGEL, J. 1988. Increase of pregnancy rate in dairy cattle after preovulatory follicle palpation and deep cornual insemination. *Theriogenology*. 29(5): 1099-1103.
- MACPHERSON, J. 1968. Semen placement effects on fertility in bovines. *Journal of Dairy Science*. 51(5): 807-808.

- MANES, J.; ALLER, J.F.; CALLEJAS, S.S.; HOZBOR, F.; ALBERIO, R.H. 2012. Influence of the length of progestagen treatment and the time of oestradiol benzoate application on the ovulatory follicle size and ovulation time in anoestrous and cyclic beef cows. *Reproduction in Domestic Animal*. 47: 412-418.
- MAPLETOFT, R.; BÓ, G.; MARTÍNEZ, M.; COLAZO, M.; CACCIA, M.; ADAMS, G. 1999. Control del desarrollo folicular y su uso en programas de inseminación artificial a tiempo fijo en ganado de carne. 3er Simposio Internacional de Reproducción Animal, Villa Carlos Paz, Argentina pp. 51-69. CD
- MARQUEZ, B.; SUAREZ, S.S. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproducción*. 70: 1626-1633.
- MARTINEZ, F.; KAABI, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; DE PAZ, P.; ANEL, L. 2004. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. *Theriogenology*. 62: 1264-1270.
- MATTNER, P.E. 1963. Spermatozoa in the genital tract of the ewe. II. Distribution after coitus. *Australian Journal of Biological Sciences*. 16(3): 687-694.
- MATTNER, P.E. 1966. Formation and retention of the spermatozoan reservoir in the cervix of the ruminant. *Nature*. 212: 1479-1480.
- MERK, F.B.; ALBRIGHT, J.T.; BOTTICELLI, C.R. 1973. The fine structure of granulosa cell nexuses in rat ovarian follicles. *The Anatomical Record*. 175: 107-126.
- MITCHELL, J.R.; SENGER, P.L.; ROSENBERGER, J.L. 1985. Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. *Journal of Animal Science*. 61: 956-967.
- MOLLER, K.; MACMILLAN, K.L.; SHANNON, P. 1972. Site of insemination and subsequent non-return rates in cows. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 15: 252-254.
- MOMONT, H.W.; SEGUIN, B.E.; SINGH, G.; STASIUKYNAS, E. 1989. Does intrauterine site of insemination in cattle really matter? *Theriogenology*. 32(1): 19-26.
- NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2004. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Animal Reproduction Science*. 80(3): 225-235.
- NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; MCGUIRE, W.J.; BELFIORE, C.J.; WILTBANK, M.C. 1994. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biology of Reproducción*. 50: 239-247.
- O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia*. 29(5): 269-275.

- ODDE, K.G. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *Journal Animal Science*. 68: 817-830.
- OVERSTREET, J.W.; COOPER, G.W. 1978. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: I. The rapid transit phase of transport. *Biology of Reproducción*. 19: 101-114.
- PERRY, G.A.; DALTON, J.C.; GEARY, T.W. 2011. Management factors influencing fertility in beef cattle breeding programs *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle-Northwest Boise, ID*. pp. 165-192.
- PINCINATO, D.; PERES, L.C.; MARAÑA PEÑA, D.; BORGES, L.F.K.; CUTAIA, L.; BÓ, G.A. 2005. Inicio de onda y ovulación en vacas con cría al pie tratadas con distintos protocolos de sincronización de la ovulación utilizando dispositivos con progesterona. 6to Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. p. 416.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; DO VALLE, E.R.; ENCARNA, R.O.; PADOVANI, C.R. 1998. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin PGF 2α or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*. 49: 667-681.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164: 666.
- PURSLEY, J.R.; SILCOX, R.W.; WILTBANK, M.C. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 81: 2139-2144.
- RANKIN, T.A.; SMITH, W.R.; SHANKS, R.D.; LODGE, J.R. 1992. Timing of insemination in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 75(10): 2840-2845.
- RIVERA, G.M.; ALBERIO, R.H. 1991. Regulación endócrina del anestro en bovinos y ovinos. *Revista Argentina de Producción Animal*. 11: 177-203.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*. 68S: S138-S146.
- ROELOFS, J.B.; BOUWMAN, E.B.P., H G; RIESTRA RASMUSSEN, Z.; SOEDE, N.M.; THOMSEN, P.D.; KEMP, B. 2006. Effect of time of artificial insemination on embryo sex ratio in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*. 93: 366-371.
- ROHDE, W.; PORSTMANN, T.; DOERNER, G. 1973. Migration of Y bearing human spermatozoa in cervical mucus. *Journal Reproduction and Fertility*. 33: 167-169.
- RORIE, R.W. 1999. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. *Theriogenology*. 52: 1273-1280.

- SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, A.M.; SANTOS, J.E.P.; PERRY, G.A.; BARUSELLI, P.S. 2010a. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science*. 120: 23-30.
- SÁ FILHO, M.F.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L.U.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; CASTRO E PAULA, L.A.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. 2010b. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science*. 118: 182-187.
- SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 663-677.
- SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A.; CIPRIANO, R.S.; JACOMINI, J.O.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, J.C.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. 2012. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 78: 510-516.
- SALES, J.N.S.; NEVES, K.A.L.; SOUZA, A.H.; CREPALDI, G.A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; DE FARIA, M.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. 2011. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology*. 76: 427-435.
- SALISBURY, G.W.; FULLER, H.K.; WILLETT, E.L. 1941. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. *Journal of Dairy Science*. 24: 905-910.
- SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *Journal Dairy Science*. 85: 2831-2842.
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproducción*. 65: 1403-1409.
- SAS. Statistical Analysis System. 1998. SAS User's guide: Statistics. Versión 6: SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- SAUMANDE, J.; HUMBLOT, P. 2004. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. *Animal Reproduction Science*. 85(3): 171-182.
- SAVIO, J.D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; WOLFENSON, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 97: 197-203.

- SCOTT, M.A. 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science*. 60: 337-348.
- SEIDEL, G.E., Jr.; ALLEN, C.H.; JOHN, L.A.; HOLLAND, M.D.; BRINK, Z.; WELCH, G.R.; GRAHAM, J.K.; CATTELL, M.B. 1997. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*. 48: 1255-1264.
- SENGER, P.L.; BECKER, W.C.; DAVIDGE, S.T.; HILLERS, J.K.; REEVES, J.J. 1988. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. *Journal of Animal Science*. 66: 3010-3016.
- SHELDON, B.C.; WEST, S.A. 2004. Maternal dominance, maternal condition, and offspring sex ratio in ungulate mammals. *The American Naturalist*. 163(1): 40-54.
- SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; BERARDINELLI, J.G.; CUSTER, E.E. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science*. 68: 799-816.
- SIROIS, J.; SAYASITH, K.; BROWN, K.A.; STOCK, A.E.; BOUCHARD, N.; DORE, M. 2004. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human Reproduction Update*. 10(5): 373-385.
- STAHRRINGER, R.C.; VISPO, P.E.; PRIETO, P.N.; FOGLIATTI, G. 2011. Evaluación del pintado en la cola en protocolos de IATF en vacas Braford pluríparas. 9no Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba, Argentina. p. 336.
- STEVENSON, J.S.; CALL, E.P.; SCOPY, R.K. 1990. Double insemination and gonadotropin-releasing hormone treatment of repeat-breeding dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 73(7): 1766-1772.
- STEVENSON, J.S.; LAMB, G.C.; HOFFMANN, D.P.; MINTON, J.E. 1997. Interrelationships of lactation and postpartum anovulation in suckled and milked cows. *Livestock Production Science*. 50(1-2): 57-74.
- STROUD, B. 2012. Consequences of mishandling frozen semen and embryos. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. Sioux Falls, SD pp. 191-203.
- SUAREZ, S.S. 1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biology of Reproducción*. 58: 1105-1107.
- SUAREZ, S.S. 2007. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reproduction, Fertility and Development*. 19: 103-110.
- TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L.A.; DUFOUR, J.J. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. 73: 3141-3151.

- ULBERG, L.C.; CHRISTIAN, R.E.; CASIDA, L.E. 1951. Ovarian response in heifers to progesterone injections. *Journal of Animal Science*. 10: 752-759.
- VANDEMARK, N.L.; MOELLER, A.N. 1951. Speed of spermatozoan transport in reproductive tract of estrous cow. *American Journal of Physiology*. 165(3): 674-679.
- VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DE PAUW, I.; DEWULF, J.; VERVAET, C.; DE KRUIF, A. 2004. Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle. *Theriogenology*. 61: 103-115.
- VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; THYS, M.; DE KRUIF, A. 2005. Low dose insemination in cattle with the Ghent device. *Theriogenology*. 64: 1716-1728.
- VITTONI, J.S.; ALLER, J.F.; OTERO, G.; SCENA, C.; ALBERIO, R.H.; CANO, A. 2011. Destete precoz y desempeño reproductivo en vacas tratadas con progesterona intravaginal. *Archivos de zootecnia*. 60: 1065-1076.
- WALKER, W.L.; NEBEL, R.L.; MCGILLIARD, M.L. 1996. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 79: 1555-1561.
- WALTERS, D.L.; SCHALLENBERGER, E. 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 71: 503-512.
- WATSON, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7: 871-891.
- WATSON, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 481-492.
- WATSON, P.F.; DUNCAN, A.E. 1988. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 25: 131-142.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82: E63-74.
- WEHNER, G.R.; WOOD, C.; TAGUE, A.; BARKER, D.; HUBERT, H. 1997. Efficiency of the ovatec unit for estrus detection and calf sex control in beef cows. *Animal Reproduction Science*. 46: 27-34.
- WERT, S.E.; LARSEN, W.J. 1990. Preendocytotic alterations in cumulus cell gap junctions precede meiotic resumption in the rat cumulus-oocyte complex. *Tissue and cell*. 22(6): 827-851.
- WETTEMANN, R.P.; LENTS, C.A.; CICCIOLO, N.H.; WHITE, F.J.; RUBIO, I. 2003. Nutritional- and suckling-mediated anovulation in beef cows. *Journal of Animal Science*. 81(E. Suppl. 2): E48-E59.

- WILMUT, I.; HUNTER, R.H.F. 1984. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. *Reproduction Nutrition Développement*. 24(4): 461-468.
- WILLIAMS, B.L.; SENGER, P.L.; OBERG, J.L. 1987. Influence of cornual insemination on endometrial damage and microbial flora in the bovine uterus. *Journal of Animal Science*. 65: 212-216.
- WILLIAMS, G.L. 1990. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. *Journal of Animal Science*. 68: 831-852.
- WILLIAMS, M.; HILL, C.J.; SCUDAMORE, I.; DUNPHY, B.; COOKE, I.D.; BARRATT, C.L.R. 1993. Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Human Reproduction*. 8: 2019-2026.
- WRIGHT, I.A.; RHIND, S.M.; WHYTE, T.K.; SMITH, A.J. 1992. Effects of body condition at calving and feeding level after calving on LH profiles and the duration of the post-partum anoestrous period in beef cows. *Animal Production*. 55: 41-46.
- YAMAGUCHI, R.; MURO, Y.; ISOTANI, A.; TOKUHIRO, K.; TAKUMI, K.; ADHAM, I.; IKAWA, M.; OKABE, M. 2009. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. *Biology of Reproducción*. 81: 142-146.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. pp.189-317.
- YAVAS, Y.; WALTON, J.S. 2000. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. *Theriogenology*. 54: 1-23.
- YOUNGLAI, E.V.; PAN, C.C.; BHAVNANI, B.R. 1981. Asymmetric distribution of male and female fetuses in the pregnant rabbit uterus. *Experientia*. 37(7): 690-691.
- ZHENG, J.; FRICKE, P.M.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. 1994. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biology of Reproducción*. 51: 623-632.
- ZOBEL, R.; GERES, D.; PIPAL, I.; BUIC, V.; GRACNER, D.; TKALCIC, S. 2011. Influence of the semen deposition site on the calves' sex ratio in Simmental dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animal*. 46(4): 595-601.

9. PUBLICACIÓN SURGIDA DE LA PRESENTE TESIS

ROSATTI, G.N.; ALLER, J.E.; VITTONI, J.S.; CALLEJAS, S.S.; ALBERIO, R.H.
2012. Efecto de la dosis reducida de espermatozoides combinada con la
inseminación intracornual profunda a tiempo fijo sobre la tasa de gestación en
vacas para carne tratadas con progesterona. *Taurus*. 56: 18-23.