

## PROGRAMAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO DE ALTA FERTILIDAD CON SEMEN SEXADO

### Programas de fixed-time artificial insemination de alta fertilidad con semen sexado

G.A. Bó<sup>1,2</sup>, E. Huguenine<sup>3</sup>, Andrés Vera Cedeño<sup>1,2</sup>, J.J. de la Mata<sup>4</sup>, R.L.S. de Carneiro<sup>5</sup>, A. Menchaca<sup>6</sup>

- <sup>1</sup> Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Zona Rural, General Paz (5145), Córdoba, Argentina.
- <sup>2</sup> Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Villa María, Villa del Rosario, Córdoba, Argentina.
- <sup>3</sup> Actividad Privada, SAV, San Luis, Argentina
- <sup>4</sup> Actividad Privada y Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de La Pampa, Argentina
- <sup>5</sup> ST Genetics Argentina, Carmen de Areco, Argentina
- <sup>6</sup> Fundación IRAUy, Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Montevideo, Uruguay.

\* Corresponding author:  
Gabriel Bó, e-mail:  
gabrielbo62@gmail.com

Recibido: 07/04/2022

Aceptado: 11/05/2022

Publicado: 31/07/2022

#### ABSTRACT

For years, researchers have been seeking to manipulate sex before conception. Although the use of sexed semen has been of great interest in the past 20 years to inseminate dairy heifers, the massive use of sexed semen was somewhat limited because fertility was compromised and could not be solved by increasing the number of sperm per inseminating dose. However, new simplified and less traumatic procedures for sperm have recently been developed that have significantly improved pregnancy rates obtained with sexed semen. However, for the massive use of this technology it is necessary to develop fixed-time Artificial Insemination (FTAI) programs for sexed semen. Therefore, a series of experiments were carried out on heifers in cows with calf on foot. In all cases the animals were synchronized with the help of paint at the base of the tail to detect the presentation of jealousy and optimize the IATF schedules. Although pregnancy rates were generally higher for conventional semen than for sexed semen, pregnancy rates with sexed semen were 45 to 50%. Therefore, the results of the experiments carried out show that IATF protocols can be adapted for the use of sexed semen and thus enable the massive use of this technology.

**Keywords:** Semen, sexing, insemination, fixed time, cows, heifers.

#### RESUMEN

Durante años, los investigadores vienen buscando manipular el sexo antes de la concepción. Si bien la utilización de semen sexado mantuvo gran interés en los últimos 20 años para inseminar vaquillonas de leche, el uso masivo del semen sexado se vio de alguna manera limitado debido a que la fertilidad estaba comprometida y no se podía solucionar aumentando el número de espermatozoides por dosis inseminante. Sin embargo, se han desarrollado recientemente nuevos procedimientos simplificados y menos traumáticos para los espermatozoides que han permitido mejorar significativamente las tasas de preñez obtenidas con semen sexado. Sin embargo, para la utilización masiva de esta tecnología es necesario el desarrollo de programas de Inseminación Artificial a tiempo fijo (IATF) para semen sexado. Por lo tanto, se realizó una serie de experimentos en vaquillonas en vacas con cría al pie. En todos los casos los animales fueron sincronizados con la ayuda de pintura en la base de la cola para detectar la presentación de celos y optimizar los horarios de IATF. Si bien las tasas de preñez fueron en general mayores para semen convencional que para semen sexado, las tasas de preñez con semen sexado fueron del 45 al 50%. Por lo tanto, los resultados de los experimentos realizados demuestran que se pueden adaptar protocolos de IATF para la utilización de semen sexado y de esta manera posibilitar el uso masivo de esta tecnología.

**Palabras clave:** Semen, sexado, inseminación, tiempo fijo, vacas, vaquillas

## INTRODUCCION

En los últimos 20 años se han realizado progresos significativos en la mejor comprensión de los patrones del crecimiento de los folículos ováricos bovinos y como se puede sincronizar su crecimiento y ovulación (Bó et al., 2013). En la actualidad existe una amplia gama de tratamientos de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) disponibles para ser utilizados tanto en rodeos de carne como de leche (Bó et al., 2013). Básicamente los programas de IATF utilizados en la actualidad se agrupan según el tipo de hormona utilizada. Los protocolos denominados "OvSynch" (Pursley et al., 1995) y "Co-Synch" (Geary et al., 2001) utilizan análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y prostaglandinas (PGF) para la sincronización de la ovulación. También los tratamientos "Co-Synch" han sido utilizados junto a la inserción de un dispositivo con progesterona (Lamb et al., 2001; Martínez et al., 2002) resultando en mejores tasas de preñez en vacas y vaquillonas para carne. Por otro lado, están los protocolos que emplean benzoato de estradiol (EB; Bó et al., 2002) y dispositivos con P4, que son los más utilizados en Argentina (Bó et al., 2013). En los últimos años, este último tratamiento se vio simplificado debido a la aplicación de cipionato de estradiol (ECP) como inductor de ovulación (Colazo et al., 2003), logrando alcanzar aceptables tasas de preñez en vacas de carne (Bó et al., 2013; Uslenghi et al., 2014). Sin embargo, se han reportado recientemente que las tasas de preñez se podrían incrementar si se disminuye el período de crecimiento del folículo dominante ovulatorio y se prolonga la duración del proestro (Bridges et al., 2008, 2012, Colazo y Ambrose, 2011, Bó et al., 2016).

Recientemente se ha desarrollado un nuevo tratamiento utilizando un protocolo basado en EB y un dispositivo con progesterona (que son las hormonas más usadas en Argentina) pero donde la remoción del dispositivo fue realizada 6 días después (en lugar de 8) y se prolongó el proestro administrando GnRH como inductor de la ovulación a las 72 h de retirar el dispositivo en lugar de ECP al retiro. Este protocolo fue denominado J-Synch (de la Mata y Bó, 2012). En trabajos posteriores se encontró que las tasas de preñez a la IATF tendieron a ser mayores con el protocolo J-Synch que con el protocolo convencional utilizado en Argentina en vaquillonas Holstein (Ré et al., 2014; 2015) y significativamente mayores en vaquillonas de carne y receptoras de embriones (Bó et al., 2016, Menchaca et al., 2016). Este protocolo promueve modificaciones durante el proestro y define un perfil endocrino preovulatorio que está positivamente asociado con un CL más competente y una mejora del medioambiente uterino (de la Mata et al., 2018). La mayor preñez obtenida con el protocolo J-Synch en vaquillonas sugiere que podría ser una alternativa interesante para aplicar en programas de IATF con semen sexado.

## USO DE SEMEN SEXADO EN PROGRAMAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Durante años, los investigadores vienen buscando manipular el sexo antes de la concepción (Garner y Seidel, 2008). Esta determinación del sexo en rodeos de carne y leche puede ser uno de los factores determinantes para mejorar el desempeño productivo y económico de la actividad. Por ejemplo, en los tambos el ternero macho tiene poco o ningún valor zootécnico. Sin embargo, en los establecimientos de carne el ternero macho

es el sexo de interés debido a un mayor potencial de producción. Teniendo en cuenta esas particularidades, se han realizado muchas investigaciones con el objetivo de predecir y/o manipular la proporción del sexo de los terneros. La separación de los espermatozoides Y de los espermatozoides X es posible debido a las diferencias en el contenido del ADN de esas células espermáticas (espermatozoide X posee cerca del 4% más ADN que el espermatozoide Y), siendo realizada por citometría de flujo. Esta biotécnica asocia la emisión de rayos láser, la coloración diferencial (usando el fluorocromo Hoechst 33342) de los espermatozoides y las fuerzas hidrodinámicas que dirigen el espermatozoide en el momento de la lectura durante el proceso de separación de los espermatozoides con cromosomas X e Y (Beltsville Sperm Sexing Technology).

Si bien la utilización de semen sexado mantuvo gran interés en los últimos 20 años para inseminar vaquillonas de leche, el uso masivo del semen sexado se vio de alguna manera limitado debido a que la fertilidad estaba comprometida y no se podía solucionar aumentando el número de espermatozoides por dosis inseminante (DeJarnette et al., 2011). Los factores que afectan las tasas de concepción con semen sexado a la inseminación artificial (IA) dependen del toro (fertilidad intrínseca), procesamiento del semen, cantidad de espermatozoides, momento de la IA y del historial reproductivo de la vaca. Estos factores se ven afectados a su vez por potenciales "estresores" durante el proceso de separación espermática como la adición del fluorocromo Hoechst 33342, exposición a luz ultravioleta, incubación a altas temperaturas, cambios de presión, campos electrostáticos, estrés oxidativo, además del proceso de congelación de semen (de Graaf et al., 2014). Sin embargo, se ha desarrollado recientemente un nuevo procedimiento simplificado y menos traumático para los espermatozoides sexados denominado SexedULTRA, donde inclusive se ha planteado la opción de aumentar el número de espermatozoides por pajuela de 2.1 millones como se utilizaba con el semen XY a 4 millones de espermatozoides con el SexedULTRA (Vishwanath, 2015).

Esta nueva tecnología consta de nuevos métodos para la manipulación y procesado antes de la separación espermática, fundamentalmente cambios en la composición de los medios utilizados en los estadios del proceso de separación, promoviendo un ambiente más inocuo que evita cambios de pH y temperatura, respetando la integridad de los espermatozoides (de Graaf et al., 2014). Estudios recientes reportaron que el proceso SexedULTRA resulta en una mayor viabilidad e integridad de los espermatozoides pos descongelado (Gonzales-Marín et al., 2017), resultando en una mayor producción de embriones in vitro en comparación con el método más antiguo (llamado XY o Legacy; González-Marín et al., 2018). Es indudable que, para la utilización efectiva de esta tecnología, tanto en rodeos lecheros como de carne se deberían desarrollar protocolos de IATF para semen sexado (Kasimanickam, 2015).

En un experimento preliminar realizado por nuestro grupo (Ré et al., no publicado) se utilizaron 200 vaquillonas que fueron tratadas con el protocolo J-Synch con un dispositivo de 0,5 g de progesterona (SynkroXY, Proagro, Argentina) e inseminadas a las 72 h de la remoción del dispositivo. En este caso las vaquillonas fueron pintadas en la base de la cola y las despintadas fueron IATF a las 72 h, mientras que las

pintadas fueron IA 12 h después que se despintaran en los próximos dos días. De las 100 vaquillonas con semen convencional se inseminaron todas a las 72 h y se preñó el 56%. De las IA con semen sexado 72 vaquillonas fueron IA a las 72 h y se preñaron el 51%, 16 vaquillonas fueron IA a las 96 h y se preñaron el 69% y otras 8 vaquillonas fueron IA a las 120 h y se preñaron el 38%, 5 quedaron sin inseminar. La preñez general no fue diferente entre los grupos (56% para el semen convencional vs 53% para las con semen sexado;  $P > 0,2$ ).

El objetivo de este review es presentar resultados de experimentos realizados recientemente utilizando el protocolo J-Synch en vacas y vaquillonas inseminadas con semen sexado. El objetivo secundario fue evaluar la tasa de preñez de distintos toros utilizando semen convencional y SexedULTRA en programas de IATF. Por último, se presentarán resultados preliminares de un semen sexado con un 65% de sexo elegido, a diferencia del 90% que tiene el SexedULTRA y con una mayor concentración de espermatozoides para ser utilizado en vacas de carne con cría al pie.

## EXPERIMENTOS EN VAQUILLONAS PARA CARNE

### Experimento 1

Se utilizaron 357 vaquillonas Angus que fueron tratadas con el protocolo J-Synch. En el Día 0 recibieron un dispositivo intravaginal (DIB 0,5, Zoetis, Argentina) y 2 mg de EB (Gonadiol, Zoetis) por vía i.m., 500 µg de cloprostenol (PGF, Ciclase, Zoetis) en el día de la remoción del dispositivo (Día 6) y se pintó en la base de la cola con pintura como método visual en la detección de celo. Las vaquillonas que manifestaron celo a las 72 h post remoción del dispositivo (pintura alterada), fueron divididas en dos subgrupos al azar para ser IATF con semen sexado hembra (SexedULTRA de 4 millones de espermatozoides) o con semen convencional no sexado (Convencional). Las vaquillonas que no manifestaron celo a las 72 h (pintura sin alterar) recibieron 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH, Gonasyn gdr, Zoetis) en ese momento y fueron IATF a las 84 h post remoción del dispositivo con semen sexado o con semen convencional. El semen sexado y

convencional provenía de un mismo toro y del mismo eyaculado y fue provisto por la Empresa Sexing Technologies de Argentina. Los diagnósticos de gestación se llevaron a cabo 30 días post IATF mediante ultrasonografía (Honda HS 101 v, Japón). Los resultados se encuentran indicados en la Tabla 1. Hubo un 57,7% (206/357) de vaquillonas en celo a las 72 h y una tasa de preñez general del 53,8%. Las tasas de preñez fueron mayores ( $P < 0,01$ ) para semen convencional que para semen sexado. A su vez las vaquillonas que mostraron celo tuvieron una mayor ( $P < 0,01$ ) tasa de preñez que las que no mostraron celo.

### Experimento 2

En el experimento 2 se utilizaron 850 vaquillonas Angus y Angus cruza Simmental que fueron tratadas con el protocolo J-Synch como en el Experimento 1, excepto que todas las vaquillonas recibieron 300 IU de eCG (Novormón 5000, Zoetis) en el momento de la remoción del dispositivo. En este experimento se detectó celo con pintura como en el experimento anterior, pero en este caso la lectura de la pintura se realizó a las 60 y 72 h de la remoción del dispositivo. Las vaquillonas con la pintura alterada fueron divididas en dos subgrupos para ser IATF con semen sexado (SexedULTRA de 4 millones de espermatozoides) o con semen convencional. Las vaquillonas que no manifestaron celo a las 72 h (pintura sin alterar) recibieron GnRH en ese momento y fueron IATF a las 84 h post remoción del dispositivo con semen sexado o con semen convencional. El semen sexado y convencional provino de 4 toros Angus y fue provisto por la Empresa Sexing Technologies de Argentina. Los diagnósticos de gestación se llevaron a cabo 30 días post IATF mediante ultrasonografía. En el Experimento 2 hubo un mayor ( $P < 0,01$ ) porcentaje de vaquillonas en celo a las 60 y 72 h (72,7%) que en el Experimento 1 y una tasa de preñez general del 54%. En este caso hubo efectos significativos de establecimiento ( $P < 0,01$ ), toros ( $P < 0,02$ ) y tipo de semen ( $P < 0,01$ ) en las tasas de preñez. También hubo un efecto significativo del horario del celo ( $P < 0,01$ ) pero no hubo interacción entre tipo de semen y horario del celo ( $P > 0,5$ ). Los resultados están indicados en las Tablas 2, 3 y 4.

**Tabla 1.** Tasas de preñez en vaquillonas Angus inseminadas con semen sexado SexedULTRA de 4 millones de espermatozoides o convencional de acuerdo con la expresión o no de celo (lectura de pintura) a las 72 h de la remoción del dispositivo con progesterona.

	n	Celo 72 h IATF 72 h	Sin Celos a 72 h, IATF 84 h	Total
SexedULTRA (4 millones)	180	58/106 (54,7%) <sup>a*</sup>	24/74 (32,4%) <sup>a**</sup>	82/180 (45,5%) <sup>a</sup>
Convencional (25 millones)	177	70/100 (70,0%) <sup>b*</sup>	40/76 (52,6%) <sup>b**</sup>	110/176 (62,5%) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> los porcentajes entre semen sexado y convencional difieren ( $P < 0,01$ )

<sup>\*\*</sup> Los porcentajes entre horarios de IATF difieren ( $P < 0,01$ )

**Tabla 2.** Tasas de preñez en vaquillonas Angus inseminadas con semen sexado o convencional de acuerdo a la expresión o no de celo (lectura de pintura) a las 60 o 72 h de la remoción del dispositivo con progesterona.

	n	Celo 60 h IATF 72 h	Celo 72 h IATF 72 h	Sin celo a las 60 ó 72 h, IATF 84 h	Total
SexedULTRA (4 millones)	426	104/176 (59,0%) <sup>c</sup>	61/134 (45,5%) <sup>d</sup>	45/116 (38,8%) <sup>e</sup>	210/426 (49,3%) <sup>a</sup>
Convencional (25 millones)	424	119/172 (69,2%) <sup>cd</sup>	79/136 (58,0%) <sup>e</sup>	49/116 (42,2%) <sup>e</sup>	247/424 (58,3%) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> los porcentajes difieren entre semen sexado y convencional ( $P < 0,01$ ).

<sup>cde</sup> los porcentajes difieren entre horarios de celo y entre semen sexado y convencional ( $P < 0,05$ ).

<sup>fd</sup> los porcentajes difieren entre los horarios de celo ( $P < 0,01$ ).

**Tabla 3.** Tasas de preñez en vaquillonas Angus inseminadas con semen sexado o convencional. Efecto del toro sobre las tasas de preñez.

	n	Toro 1	Toro 2	Toro 3	Toro 4
SexedULTRA (4 millones)	426	65/123 (52.8%)	50/97 (51.5%)	73/123 (59.3%)	22/83 (26.5%)
Convencional (25 millones)	424	75/123 (61.0%)	56/96 (58.3%)	82/121 (67.8%)	34/84 (40.5%)

<sup>ab</sup>. Los porcentajes totales de preñez difieren entre toros ( $P < 0,02$ ).

**Tabla 4.** Tasas de preñez en vaquillonas Angus inseminadas con semen sexado o convencional. Efecto Establecimiento sobre las tasas de preñez.

	n	SexedULTRA (4 millones)	Convencional (25 millones)	Total
Establecimiento 1	244	73/123 (59,3%)	82/121 (67,8%)	155/244 (63,5%) <sup>a</sup>
Establecimiento 2	128	18/63 (28,5%)	22/65 (33,8%)	40/128 (31,2%) <sup>c</sup>
Establecimiento 3	97	26/50 (52,0%)	22/47 (46,8%)	48/97 (49,5%) <sup>b</sup>
Establecimiento 4	96	29/47 (61,7%)	34/49 (69,4%)	63/96 (65,6%) <sup>a</sup>
Establecimiento 5	181	46/91 (50,5%)	61/90 (67,7%)	107/181 (59,1%) <sup>a</sup>
Establecimiento 6	104	18/52 (34,6%)	26/52 (50,0%)	44/104 (42,3%) <sup>b</sup>

<sup>abc</sup>. Los porcentajes totales de preñez difieren entre establecimientos ( $P < 0,02$ ).

### Experimento 3

El objetivo del Experimento 3 fue determinar el mejor momento del IATF con semen sexado en vaquillonas, sobre todo en las que muestran celo a las 72 h de la remoción del dispositivo. Se utilizaron 783 vaquillonas Angus (253 en el 2017/18 y 530 en el 2018/19) que fueron tratadas con el protocolo J-Synch. En el Día 0 recibieron un DIB 0,5 y 2 mg de BE; PGF 300 UI de eCG en el día de la remoción del dispositivo (Día 6) y se pintaron en la base de la cola como método visual de detección de celo, que fue observado a las 60, 72 y 84 h. Las vaquillonas que manifestaron celo a las 60 h (pintura borrada >50%), fueron IATF a las 72 h post remoción del dispositivo. Las que a las 72 h estaban despintadas, fueron divididas al azar para ser IATF a las 72 h o a los 84 h. Las vaquillonas que no manifestaron esto a las 72 h (pintura sin alterar) recibieron GnRH en ese momento y fueron IATF a las 84 h. Los diagnósticos de gestación se llevaron a cabo 30 días post IATF mediante ultrasonografía.

Para el análisis estadístico se tuvo en cuenta las que entraron en celo a las 60 h y fueron IATF a las 72 h, las que estaban en celo a las 72 h y fueron IATF a las 72 h u 84 h y las que no estaban en celo a las 72 h y recibieron GnRH y fueron IATF a las 84 h. Los diagnósticos de gestación se llevaron a cabo 30 días post IATF mediante ultrasonografía.

**Tabla 5.** Tasas de preñez en vaquillonas Angus inseminadas con semen sexado de acuerdo con la expresión o no de celo (lectura de pintura) a las 60, 72 o 84 h de la remoción del dispositivo con progesterona.

	Celo 60 h IATF 72 h	Celo 72 h IATF 72 h	Celo 72 h IATF 84 h	No Celos IATF 84 h
Sexed ULTRA® (4 mill)	104/176 (49,0%)	51/94 (54,3%)	39/103 (57,3%)	130/249 (52,2%)

El porcentaje de vaquillonas en celo a las 60 y 72 h fue de 76,6%, con una tasa de preñez general de 50% en el 2017/18 y de 53% en el 2018/2019 ( $P > 0,4$ ). Por lo tanto,

se combinaron los datos de las dos temporadas para realizar el análisis estadístico. En este caso no hubo efectos significativos de establecimiento ( $P > 0,4$ ), de toros ( $P > 0,7$ ), del horario del celo ( $P > 0,7$ ) y del horario de IATF ( $P > 0,8$ ) sobre la tasa de preñez. Los resultados están indicados en las Tablas 5, 6 y 7.

**Tabla 6.** Tasas de preñez en vaquillonas Angus inseminadas con semen sexado. Efecto del toro sobre las tasas de preñez

	n	Toro 1	Toro 2	Toro 3
SexedULTRA® (4 millones)	783	238/457 (52.1%)	48/110 (43.6%)	119/216 (55.1%)

Los porcentajes totales de preñez no difieren entre toros ( $P > 0,7$ ).

**Tabla 7.** Tasas de preñez en vaquillonas Angus inseminadas con semen sexado. Efecto Establecimiento sobre las tasas de preñez

	n	SexedULTRA® (4 millones)
Establecimiento 1	293	157/293 (53,6%)
Establecimiento 2	120	51/120 (42,5%)
Establecimiento 3	93	44/93 (47,3%)
Establecimiento 4	75	37/75 (49,3%)
Establecimiento 5	96	52/96 (56,3%)
Establecimiento 6	106	64/106 (60,4%)

Los porcentajes totales de preñez no difieren entre establecimientos ( $P > 0,4$ ).

Los resultados de este último experimento confirman los de las temporadas anteriores, que se pueden obtener tasas de preñez de alrededor del 50% en vaquillonas de carne inseminadas con semen sexado. Además, de acuerdo con los resultados de este experimento y los anteriores, la recomendación de inseminación con el protocolo J-Synch sería inseminar todos los animales en celo (con la pintura borrada >50%) a las 72 h y los que no tienen la pintura borrada en ese momento deben recibir GnRH a las 72 h y ser inseminadas con semen sexado o convencional a las 84 h.

## EXPERIMENTOS EN VACAS DE CARNE CON CRÍA AL PIE

### Experimento 4

En este experimento se utilizaron un total de 877 vacas con cría al pie en cuatro establecimientos ganaderos de San Luis y La Pampa. Las vacas tenían 45 a 90 días postparto, una condición corporal de entre 3 a 3,5 y con un CL o Foliculos >8 mm de diámetro y fueron tratadas con el protocolo J-Synch con 400 IU eCG. En este experimento se detectó celo con pintura como en el Experimento 2 y las vacas fueron divididas en dos subgrupos para ser IATF con semen SexedULTRA o convencional de 5 toros (3 de los cuales ya habían sido

utilizado en los experimentos de vaquillonas). Los diagnósticos de gestación se llevaron a cabo 30 días post IATF mediante ultrasonografía. En este experimento el porcentaje de vacas en celo a las 60 y 72 h fue del 71,3% y la tasa general de preñez fue del 57%. En este caso hubo una diferencia de tipo de semen, momento de celo ( $P<0,01$ ) y el toro utilizado ( $P<0,05$ ). No hubo interacciones y tampoco hubo diferencias entre los cuatro establecimientos donde se realizó el experimento (Rango 52 a 59%). Los resultados de preñez para los distintos horarios de celo e IATF están indicados en la Tabla 8 y para cada toro utilizado en la Tabla 9.

**Tabla 8.** Tasas de preñez en Angus con cría al pie inseminadas con semen sexado o convencional de acuerdo con la expresión o no de celo (lectura de pintura) a las 60 o 72 h de la remoción del dispositivo con progesterona.

	n	Celo 60h IATF 72h	Celo 72h IATF 72h	Celo 84h IATF 84h	No Celos IATF 84h	Total
SexedULTRA (4 millones)	435	93/228 (40,8%) <sup>d</sup>	34/79 (43,0%) <sup>d</sup>	20/29 (70,6%) <sup>c</sup>	50/104 (48,1%) <sup>d</sup>	197/435 (45,3%) <sup>a</sup>
Convencional (25 millones)	442	154/234 (65,8%) <sup>c</sup>	57/84 (67,9%) <sup>c</sup>	20/24 (83,3%) <sup>c</sup>	69/95 (72,6%) <sup>c</sup>	303/442 (68,6%) <sup>b</sup>

ab, los porcentajes difieren entre semen sexado y convencional ( $P<0,01$ ).

cd, los porcentajes difieren entre horarios de celo y entre semen sexado y convencional ( $P<0,05$ ).

fg, los porcentajes difieren entre los horarios de celo ( $P<0,01$ ).

**Tabla 9.** Tasas de preñez en vacas Angus con cría al pie inseminadas con semen sexado o convencional. Efecto del toro sobre las tasas de preñez.

	n	Toro 1	Toro 2	Toro 3	Toro 4	Toro 5
SexedULTRA (4 millones)	435	26/47 (55,3%)	66/153 (43,1%)	95/197 (48,2%)	3/7 (43%)	8/31 (25,8%)
Convencional (25 millones)	442	27/42 (64,3%)	113/153 (73,9%)	142/208 (68,3%)	5/7 (71,4%)	17/32 (53,1%)

ab, Los porcentajes totales de preñez tienden a diferir entre toros ( $P<0,08$ ).

### Experimento 5

El objetivo de este experimento fue evaluar las tasas de preñez y proporción de machos y hembras en vacas de carne con cría al pie IATF con semen convencional (no sexado, 25 millones de espermatozoides por dosis) y en este caso en lugar de usar semen SexedULTRA de 4 millones y con un 90% de exactitud en el sexado, se utilizó con semen sexado con el mismo procedimiento que el sexedULTRA pero con un distintas proporciones de espermatozoides X e Y (65% de hembras) pero con una mayor concentración espermática por pajuela. La idea de este semen es poder utilizarlo más masivamente en rodeos comerciales de vacas de carne y darles la opción a los productores de alterar el porcentaje de terneros producidos de acuerdo con sus necesidades, o sea tener más terneros machos para engordar o más terneras hembras para crecer en el número de vacas en el programa productivo. En este caso se utilizaron 558 vacas Angus y Hereford con cría al pie. En el Día 0 todas las vacas recibieron un dispositivo intravaginal con 0.6 g de P4 (Pluselar, Calier, Argentina) y 2 mg de EB (Benzoato de estradiol, Calier) por vía IM. En el Día 8 las vacas recibieron 150 µg de D+cloprostenol (Veteglan, Calier), 400 UI de eCG (Vetegon, Calier) en el día de la remoción del dispositivo y 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipionato de estradiol, Calier) y se pintó en la base de la cola con pintura como método visual en la detección de celo que fue observado

a las 48 h. Las vacas que manifestaron celo a las 48 h post remoción del dispositivo (pintura alterada) fueron IATF en ese momento con semen convencional o con semen sexado 65/35 (denominado semen Superconvencional) en dos concentraciones: 6 y 8 millones de espermatozoides totales por pajuela. Las que no manifestaron celo (pintura sin alterar) a las 48 h recibieron GnRH (8 µg, Pluserelina, Calier) IM en ese momento y fueron IATF a las 48-50 h con los tres tipos de semen ya mencionados. Los diagnósticos de gestación se llevaron a cabo entre los 64 y 74 días post IATF para diagnosticar preñez y determinar el sexo de estas.

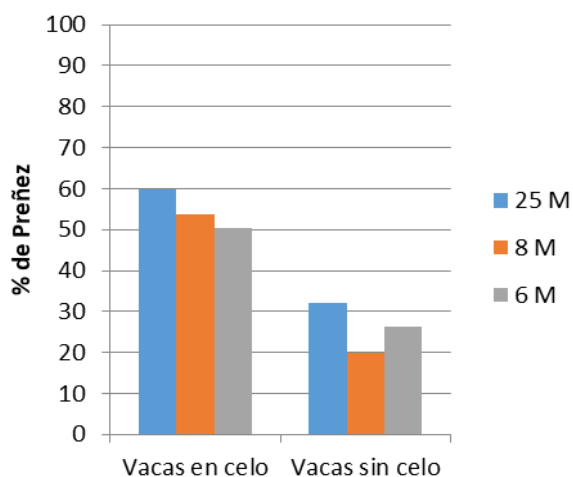
Los resultados están indicados en la Tabla 10 y Figuras 1 y 2. No hubo diferencias significativas en la tasa de preñez entre los dos toros utilizados (Figura 2) y el tipo de semen (Convencional vs Superconvencional; Tabla 10 y Figura 2). Sin embargo, las vacas que mostraron signos de celo antes o durante la IATF (despintadas) tuvieron una mayor ( $P<0,01$ ) tasa de preñez que las vacas que no mostraron celo (Tabla 4 y Figura 1). Con respecto a la proporción de machos y hembras en los tres grupos, el semen convencional tuvo un 51% de hembras (50/98), mientras que este porcentaje de hembras fue del 65,5% (55/84) para las vacas inseminadas con semen superconvencional de 8 millones de espermatozoides y del 65,3% (51/78) para las vacas inseminadas con semen

superconvencional de 6 millones de espermatozoides (Figura 3).

**Tabla 10.** Tasas de preñez en Vacas Angus y Hereford con cría al pie, inseminadas con semen convencional o superconvencional de acuerdo con la expresión de celos.

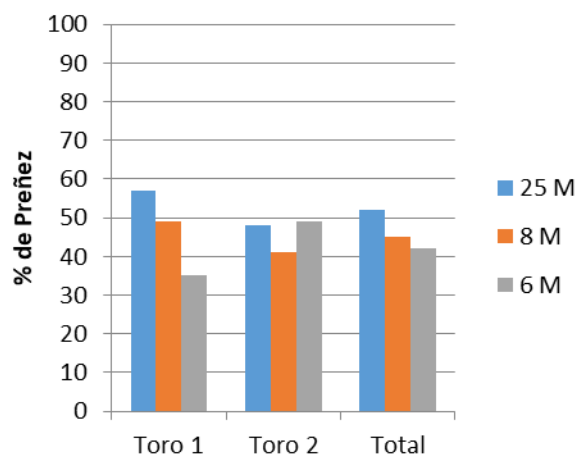
	Celo	No Celo	Total
Convencional (25 millones)	82/137 (59,8%) <sup>a</sup>	16/50 (32,0%) <sup>b</sup>	98/187 (52,4%)
SuperConvencional (8 millones)	73/136 (53,7%) <sup>a</sup>	10/50 (20,0%) <sup>b</sup>	83/186 (44,6%)
SuperConvencional (6 millones)	63/125 (50,4%) <sup>a</sup>	16/60 (26,7%) <sup>b</sup>	79/185 (42,7%)
Total	218/398 (54,8%) <sup>a</sup>	42/160 (26,3%) <sup>b</sup>	

ab, denota diferencias en tasas de preñez entre expresión o no de celo ( $P < 0,01$ )

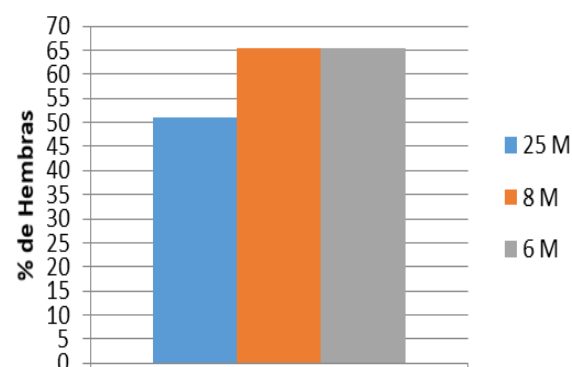


**Figura 1.** Tasas de Preñez de acuerdo con la expresión o no de celos a las 48 h y al tipo de semen. No hay diferencias entre tipo de semen ( $P > 0,13$ ), tanto para las en celo como para las que no entraron en celo. abPara todos los tipos de semen las tasas de preñez difieren entre las que entraron o no en celo ( $P < 0,01$ ).

Los resultados de este experimento demuestran que se pueden obtener resultados comparables entre semen convencional y superconvencional y que las vacas en celo tienen una mayor tasa de preñez que las que no muestran celo, donde se aprecia una baja substancial en la fertilidad en estas vacas sin celo. La causa se esto puede estar relacionada con que las vacas que no muestran celo a las 48 h y reciben GnRH ovulan en promedio 10 h después que las que muestran celo (68 h para las que muestran celo y 78 h para las que no muestran celo; Cuervo et al., 2017). Por lo tanto, se puede especular que si se atrasa la IATF de todas las vacas a las 54-58 h se pueden tener más vacas en celo que a las 48 h y mejorar, de esta manera, la tasa general de preñez. Este año se realizarán más experimentos con semen superconvencional para probar esta hipótesis.



**Figura 2.** Tasas de preñez de las vacas que entraron en celo a las 48 h, de acuerdo con el toro y tipo de semen. No hubo diferencias entre toros o entre tipo de semen ( $P > 0,1$ )



**Figura 3.** Proporción de gestaciones diagnosticadas como hembra por ultrasonografía realizada entre los 64 y 74 días después de la IATF en vacas Angus y Hereford con cría al pie inseminadas con semen convencional (no sexado) y superconvencional (sexado 65%).

Los resultados de los experimentos demuestran que se pueden adaptar protocolos de IATF con la ayuda de pintura para la detección de celo para la utilización de semen sexado en vacas y vaquillonas de carne. Cabe destacar que en ninguno de estos experimentos se realizó detección visual del comportamiento del celo, solo se utilizó una lectura de pintura a todos los animales al pasar por la manga. Esto se propone como parte del protocolo de IATF, aplicándose de manera sistemática sin requerir la observación individual del comportamiento de celo. Estos datos concuerdan con un estudio reciente (Thomas et al., 2017) en el cual vaquillonas para carne que se IATF con semen sexado cuando fueron sincronizadas con un protocolo de CIDR-B por 14 días más PGF 16 días después (60% para convencional y 52% para sexado, respectivamente).

Analizando los horarios de celo e IATF de estos experimentos, la recomendación de inseminación con el protocolo J-Synch sería inseminar todos los animales en celo (con la pintura borrada  $> 50\%$ ) a las 72 h y los que no tienen la pintura borrada en ese momento deben recibir GnRH a las 72 h y ser inseminadas con semen sexado o convencional a las 84 h. Por las escasas diferencias de tasa de preñez entre semen convencional y sexado en este grupo de animales, parecería que sería mejor inseminar a estos animales con semen sexado

a las 84 h, pero debido a que las tasas de preñez son menores en las vaquillonas sin celo, queda la decisión en el veterinario y su cliente de utilizar un semen convencional más barato en estos animales.

## CONCLUSION

Finalmente, los resultados del último experimento demuestran que se pueden obtener resultados comparables entre semen convencional y superconvencional y que las vacas en celo tienen una mayor tasa de preñez que las que no muestran celo, donde se aprecia una baja substancial en la fertilidad en estas vacas sin celo. En conclusión, los resultados de los experimentos realizados hasta ahora demuestran que utilizando la ayuda de pintura para adecuar el horario de IATF, es posible conseguir tasas de preñez aceptables utilizando semen sexado en vaquillonas y vacas para carne, con resultados de alrededor del 50%, confirmando los resultados encontrados en vaquillonas de leche.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Binelli M, Pugliese G, de Oliveira E, Martins T, Lopes E, Sponchiado M, Gonella-Díaza A, Oliveira M, Rodríguez França M, de Oliveira Cardoso B, Piffero Mello B, Souza Gomes N, Latorraca L, Cuellar Cuadros F. Programação da receptividade uterina e fertilidade em vacas de corte. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2017; 41:121-129.
- Bó GA, Cutaia L, Tríbulo R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda parte. *Taurus.* 2002; 15: 17-32.
- Bó GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. *Anim. Reprod.* 2013; 10: 137-142.
- Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology.* 2016;86(1):388-396. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.053
- Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2alpha from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology.* 2008;69(7):843-851. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.12.011
- Bridges GA, Mussard ML, Pate JL, Ott TL, Hansen TR, Day ML. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Anim. Reprod. Sci.* 2012; 133: 16-26
- Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology.* 2003;60(5):855-865. doi:10.1016/s0093-691x(03)00091-8
- Colazo MG, Ambrose DJ. Neither duration of progesterone insert nor initial GnRH treatment affected pregnancy per timed-insemination in dairy heifers subjected to a Co-synch protocol. *Theriogenology.* 2011;76(3):578-588. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.03.013
- de Graaf SP, Leahy T, Vishwanath R. Biological and practical lessons associated with the use of sexed semen. *Rumin. Reprod. Symp. Proceedings, 9th International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants.* 2014; Pp 125-140.
- Dejarnette JM, Leach MA, Nebel RL, Marshall CE, McCleary CR, Moreno JF. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible?. *J Dairy Sci.* 2011;94(7):3477-3483. doi:10.3168/jds.2011-4214
- de la Mata JJ, Bó GA. Sincronización de celos y ovulación utilizando protocolos de benzoato de estradiol y GnRH en períodos reducidos de inserción de un dispositivo con progesterona en vaquillonas para carne. *Taurus,* 2012; 55:17-23.
- de la Mata JJ, Núñez-Olivera F, Cuadro F, Bosolasco D, de Brund V, Meikle A, Bó GA, Menchaca A. Impact of extending the proestrus length in an oestradiol and progesterone-based oestrus synchronization program on follicular and luteal development, uterine gene expression, and protein localization, and pregnancy rates in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development.* 2018; 30(11) 1541-1552 (abstract).
- Garner DL, Seidel GE Jr. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology.* 2008;69(7):886-895. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.01.006
- Geary TW, Whittier JC. Effects of timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows. *The Professional Animal Scientist.* 2001; 14: 217-220.
- González-Marín C, Lenz RW, Gilligan TB, Evans KM, Góngora CE, Moreno JF and Vishwanath R. SexedULTRATM, a new method of processing sex sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and in vitro fertility. *Reprod Fertil Dev,* 2017;. 29(1) 204-204 (abstract).
- González-Marín C, Góngora CE, Gilligan TB, Evans KM, Moreno JF, Vishwanath R. In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology.* 2018;114:40-45. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.03.025
- Kasimanickam R. Utilization of sexed-sorted semen. *Bovine Reproduction. Chapter 72. Bovine Reproduction,* R.M.Hopper, Wiley Blackwell. 2015; Pp 673.
- Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci.* 2001; 79:2253-9
- Martínez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *J Anim Sci.* 2002;80(7):1746-1751. doi:10.2527/2002.8071746x

- Menchaca A, Dutra S, Carrau JM, Sapriza F, Bo GA. Improvements of the new J-Synch protocol used for fixed time embryo transfer (FTET) in beef cattle recipients transferred with in vitro produced embryos. International Congress of Animal Reproduction (ICAR), Tours, Francia, 2016. P471.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology*. 1995;44(7):915-923. doi:10.1016/0093-691x(95)00279-h
- Ré M, de la Mata JJ, Bó GA. Synchronization of ovulation in dairy heifers using a shortened estradiol-based protocol that provides for a lengthened proestrus. *Reprod. Fertil. Dev.* 2014; 26:118 (abstract).
- Ré MG, Curchod G, Alessio D, Caccia M, de la Mata JJ, Bó GA. Tratamientos que prolongan el proCelo usando estradiol y progesterona en vaquillonas de leche. Resúmenes XI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 2015; pp. 159-167.
- Thomas JM, Locke JWC, Vishwanath R, et al. Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology*. 2017;98:88-93. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.03.018
- Uslenghi G, Chaves SG, Cabodevila J, Callejas S. Effect of estradiol cypionate and amount of progesterone in the intravaginal device on synchronization of estrus, ovulation and on pregnancy rate in beef cows treated with FTAI based protocols. *Anim Reprod Sci.* 2014;145(1-2):1-7. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.12.009
- Vishwanath R. Sexed sperm vs conventional sperm – a comparative discussion. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle, 2015; pp.250-256.