

Ajuste del tiempo de inseminación con semen sexado en vacas Holstein en producción superovuladas - Setting time of artificial insemination of superovulated lactating Holstein cows with sex-sorted sperm

Argudo, D.E.: Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. Universidad de Cuenca. Ecuador, daniel.argudo@ucuenca.edu.ec | **Soria, C.A.:** Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. Universidad de Cuenca. Ecuador | **Durán, J.C.:** Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. Ecuador | **Bravo, S.E.:** Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. Ecuador | **Alvarado, J.P.:** Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. Ecuador | **Alberio, R.H.:** Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina, alberio.ricardo@inta.gob.ar

Resumen

En la actualidad los resultados del uso del semen sexado en la superovulación (SOV) no han sido muy alentadores debido a la baja cantidad de espermatozoides usada, así como a la corta vida media de los mismos. En un trabajo previo realizado en Brasil en vacas Holstein, se demostró que usando el protocolo de SOV P36/LH60 e inseminando con semen sexado a las 18 y 30 horas de aplicado el inductor de la ovulación (intervalo de 12 hs entre inseminaciones) se obtiene igual cantidad de estructuras transferibles que inseminando a las 12 y 24 horas con semen no sexado. El objetivo de esta investigación fue ajustar las horas de la inseminación artificial (IA) en vacas superovuladas e inseminadas con semen sexado para lograr mejor sincronía con las ovulaciones y así aumentar la cantidad de embriones transferibles. Se evaluaron 2 momentos de IA en los cuales el intervalo entre ambas se disminuyó a 6 hs. Para esto se usaron 30 vacas Holstein en producción superovuladas con el protocolo P36/LH60 y posteriormente se dividieron aleatoriamente en tres grupos: 1- grupo IA18/30 (control; n=10) con inseminaciones realizadas a las 18 y 30 hs de aplicado el inductor de la ovulación (GnRH); 2- grupo IA18/24 (n=10) se inseminó a las 18 y 24 hs de la GnRH y 3-grupo IA24/30 (n=10) se inseminó a las 24 y 30 hs. En todos los casos se usó 2.1×10^6 espermatozoides sexados / inseminación. No se encontró diferencia estadística en los tres grupos en la cantidad de embriones transferibles ($1,9 \pm 0,6$; $4,1 \pm 1,5$ y $1,3 \pm 0,4$ respectivamente; $p > 0,05$) ni en la proporción de embriones transferibles sobre estructuras totales (38,8%; 60,1% y 34,1% respectivamente). En conclusión, el bajo número de vacas en cada grupo y la alta variabilidad de la respuesta no permiten evidenciar diferencias significativas con las alternativas evaluadas. Sin embargo, los valores obtenidos sugieren realizar nuevos estudios para incrementar la casuística y reevaluar estos resultados.

Palabras clave: Semen sexado | Superovulación | Embriones | Vacas | Holstein

Abstract

The embryo production results after use of sex-sorted sperm to inseminate superovulated cows (SOV) have not been very encouraging so far, due to the low quantity of sperms used as well as their short half- life. In a previous study conducted in Brazil in Holstein cows, it was shown that using the protocol of SOV P36/Lh60 and inseminating with sex-sorted sperm at 18 and 30h (interval of 12hs between the two inseminations) after application of the inductor of ovulation it was obtained a similar quantity of transferable structures than inseminating at the 12 and 24h with non-sorted sperm. The aim of this investigation was to adjust the moment of the artificial insemination (AI) in superovulated and inseminated cows with sex-sorted sperm to achieve better synchrony with ovulations and by this way to increase the quantity of transferable embryos obtained. For this, we evaluated 2 moments of AI in which the interval between both were of 6hs. We used 30 lactating Holstein cows treated with the protocol P36/LH60 and, at insemination, were divided at random in three groups: 1-group AI18/30 (control group; n=10), the AI were carried out at the 18 and 30h after application of the inductor of the ovulation (GnRH); 2-group AI18/24 (n=10) the AI inseminations were made at 18 and 24 h after GnRH and 3-group AI24/30(n=10) the AI were made at 24 and 30h. In all cases, each insemination was doing with 2.1×10^6 sex-sorted sperm. The results between groups were no different in the quantity of transferable embryos ($1,9 \pm 0,6$; $4,1 \pm 1,5$ and $1,3 \pm 0,4$ respectively; $p > 0,05$) nor in the proportion of transferable from total structures (38,8%; 60,1% y 34,1% respectively). In conclusion, the low number of cows in each group and the high variability of responses do not permit to conclude on significant differences in the alternatives evaluated. However, the numerical results lead to propose new studies to increase the number of animals treated and so, reevaluate these results.

Keywords: Sex-sorted sperm | Superovulation | Embryos | Cows | Holstein

INTRODUCCION

La producción bovina enfocada a la lechería tiene como objetivo secundario la producción de hembras de reposición para poder mantener el hato. Si se considera que de todos los nacimientos solo el cincuenta por ciento serán hembras, sería económicamente más rentable y biológicamente más eficiente si fuese posible solo producir hembras. En la actualidad esto es viable con el uso de semen sexado que desde 1992 se ha venido popularizando gracias a la Citometría de flujo, herramienta que logra separar eficientemente a los espermatozoides X de los Y (Osés, Teruel, & Cabodevila, 2009; Tubman et al., 2004).

Por otra parte, la superovulación y la transferencia de embriones (SOTE) es una técnica que ha crecido en los últimos años y que ha tenido gran impacto en la multiplicación de individuos de alto valor genético y por lo tanto ha permitido acelerar el mejoramiento de las ganaderías. En el caso específico de las lecherías y, como ya se mencionó antes, la producción de hembras de reposición es fundamental para el mantenimiento de las mismas por lo cual el uso de la SOTE asociada con el uso de semen sexado es una herramienta de gran valor para lograr este objetivo.

Varios trabajos han demostrado que esta combinación no ha tenido el éxito esperado probablemente debido a factores relacionados con la calidad del semen procesado. En un trabajo de inseminación artificial realizado por Frijters et al. (2009) en el que se usó semen sexado de 7 toros, se determinó que la disminución de las tasas de preñez en relación con la obtenida con semen convencional era del 13,6%. Esta disminución resultó de la combinación de dos factores que influyeron en proporciones diferentes. Por un lado, la baja cantidad de espermatozoides utilizados, responsable del 8,6%. Esto es parte del problema, como fue demostrado en el estudio de Schenk, Suh, & Seidel Jr. (2006), quienes determinaron que pasando de 2.1×10^6 a 20×10^6 espermatozoides por dosis, no se modificó significativamente la cantidad de embriones sexados obtenidos aun cuando los valores fueron menores (1,3 vs 2,0 respectivamente).

Otra proporción de la disminución de la fertilidad del semen sexado (5%) se debe al proceso de sexado del semen propiamente dicho. También existieron diferencias significativas entre toros, lo que nos indica que no todo el semen sexado comercial tiene la misma fertilidad.

También a partir del trabajo ya mencionado de Schenk et al. (2006) se pudo concluir que la cantidad de hembras que se pueden obtener después de la SOTE con embriones producidos con semen sexado es similar a la cantidad que se puede obtener con la transferencia de embriones obtenidos con semen convencional ya que aunque se producen la mitad de embriones en el primer caso estos serán todos hembras. Por ello y a pesar de esto, resulta más interesante producir embriones con semen sexado (DeVries et al., 2008) que con semen convencional ya que con este se requiere transferir el doble de embriones (y por lo tanto de receptoras) o realizar el sexado de los mismos previo a su transferencia. Lo primero implica un alto costo en vacas receptoras (el doble del necesario para embriones sexados). Por otra parte, la biopsia de embriones no parece ser un método óptimo ya que el 50% de los embriones serán del sexo no deseado y se desecharán y por otra el biopsiado de los embriones reduce su viabilidad y la posibilidad de ser criopreservados (Hasler, Cardey, Stokes, & Bredbacka, 2002). Por ello, el uso de una cantidad suficiente de semen sexado en vacas superovuladas resultará en la producción de más gestaciones del sexo deseado con aproximadamente la mitad del número de receptoras reduciendo así el costo de producción asociado con gestaciones de sexo indeseable incrementando la producción y la eficiencia económica.

La inseminación de las vacas superovuladas (SOV) en un momento cercano a la ovulación se espera que pueda mejorar la tasa de embriones producidos ya que el sexar y congelar el semen, precapacita los espermatozoides disminuyendo su vida media y su probabilidad de poder fertilizar los ovocitos (Maxwell et al., 2004; Underwood, Bathgate, Maxwell, & Evans, 2009).

En un estudio realizado por Soares et al. (2011), en el cual utilizan un inductor de la ovulación 60 horas después de la aplicación de la prostaglandina (Barros y Nogueira, 2001), se concluye que las inseminaciones se deben hacer a las 18 y 30 horas después de la aplicación del inductor de la ovulación. Con base en este último estudio, el objetivo que se planteó en nuestro trabajo fue el de evaluar dentro de ese período si el momento más apropiado era en la primera (18/24hs) o la segunda mitad (24/30hs) reduciendo así el tiempo entre ambas inseminaciones a la mitad y tal vez mejorar lo obtenido con el intervalo más largo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 30 vacas Holstein en producción sanitariamente sanas, de tres a cinco años, una condición corporal entre 2,5 a 3,5 (escala 1-5), una producción de leche promedio de 12-18 litros, sin antecedentes de problemas reproductivos, ciclando y que tuvieron respuesta a tratamientos superovulatorios previos. Se utilizó un diseño experimental DCA.

Tratamiento de superovulación e inseminación artificial

A todas las vacas se les aplicó el protocolo de superovulación P36/LH60 descrito por Barros y Nogueira (2001) que consiste en aplicar un dispositivo intravaginal de progesterona (P4) durante siete días (día 0-7). Al momento de colocar el dispositivo de P4 (día 0) se aplicó 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Gonadiol®) intramuscular (i.m.). Entre los días 4 y 7 se aplicó FSH-p (Folltropin®) en un total de 280 mg i.m. divididas en ocho dosis decrecientes dos veces al día. En el día 6 se aplicó dos dosis de D-Cloprostenol (250 µg / dosis i.m.) conjuntamente con la sexta y séptima dosis de FSH-p. En la última dosis de FSH-p se retiró el dispositivo de P4 y 24h después se inyectó 200 µg i.m. de Acetato de Gonadorelina (GnRH).

Para la Inseminación Artificial (IA) los animales se dividieron en tres grupos:

Grupo IA18/24 (n=10) IA realizada entre 18 y 24h de la aplicación de GnRH;

Grupo IA24/30 (n=10) IA realizada entre 24 y 30h de la aplicación de GnRH y

Grupo IA18/30 (control; n=10) IA realizada entre 24 y 30h de la aplicación de GnRH. (Figura 1).

En cada IA, realizada por el mismo inseminador, se usó una pajuela de semen congelado sexado de 2.1 millones de concentración que provino de un solo toro.

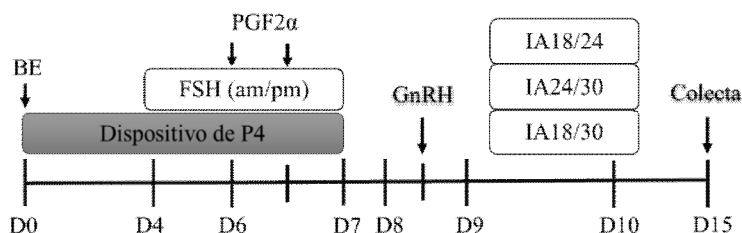


Figura 1. Esquema del tratamiento de superovulación, grupos de inseminación artificial a tiempo fijo y colecta de embriones.

Colecta y Evaluación de Embriones

En todas las vacas, a los 7 días de la primera inseminación, se realizó el proceso de colecta no quirúrgica de embriones con un circuito cerrado con flujo continuo. Los embriones fueron buscados bajo un estereoscopio de luz diascópica (15x), fueron aislados y clasificados según los parámetros de la IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones). Se registró la cantidad de estructuras recuperadas, los

ovocitos sin fecundar, los embriones degenerados o muertos (embriones de código 3 y 4) y embriones transferibles (embriones de código 1 y 2).

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico SPSS versión 23 para Windows. A los resultados obtenidos se les aplicó pruebas de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas. En las variables que presentaron datos normales y varianzas homogéneas se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de un test de Tukey, caso contrario se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Para presentar los resultados se usaron medias y desviación estándar con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

En ninguna de las variables analizadas se obtuvieron diferencias significativas (Tabla 1). Al analizar el número total de estructuras recuperadas en las diferentes horas de Inseminación Artificial (IA), se observó que el valor superior se obtuvo en el Grupo IA18/24. La misma tendencia se observó con respecto a los embriones transferibles. La proporción de embriones transferibles con respecto a estructuras totales fue de 60,3; 35,1 y 38,8% ($p>0,05$) respectivamente para Grupos IA18/24; IA24/30 y IA18/30. La proporción de ovocitos sin fertilizar, tal vez el mejor indicador del efecto semen, fue muy similar tanto en cantidades absolutas (1,1; 0,5 y 1,8) como en su proporción con respecto al total de estructuras recuperadas (13,9; 11,9 y 26,9%, $p>0,05$) respectivamente para Grupos IA18/24; IA24/30 y IA18/30. El número de embriones degenerados siguió la misma tendencia y su proporción con respecto a las estructuras totales fue respectivamente para los Grupos IA18/24; IA24/30 y IA18/30 de 19,0; 33,9 y 26,9% ($p>0,05$).

Tabla 1. Producción de Embriones Transferibles, Degenerados y Ovocitos sin fecundar en los grupos IA18/24, IA 24/30 y Control.

	Grupos		
	IA18/24	IA24/30	IA18/30 (Control)
Número de Vacas	10	10	10
Estructuras Recuperadas	6,8±1,7	3,7±0,7	4,9±0,7
Embriones Transferibles	4,1±1,5 (60,3%)	1,3±0,4 (35,1%)	1,9±0,6 (38,8%)
Embriones Degenerados	1,6±0,5 (19,0%)	1,9±0,3 (33,9%)	1,2±0,4 (26,9%)
Ovocitos sin Fecundar	1,1±0,4	0,5±0,2	1,8±0,5

Los valores mostrados son la media \pm desviación estándar ($X \pm SD$).

DISCUSIÓN

La producción de embriones por SOV con el uso de semen sexado en bovinos ha sido de gran impacto en especial en las ganaderías de leche ya que da la posibilidad de tener hembras de reposición en poco tiempo. Sin embargo los resultados en varios estudios

no han podido igualar el número embriones transferibles que se consigue cuando se insemina con semen convencional (no sexado)(Hayakawa, Hirai, Takimoto, Ideta, & Aoyagi, 2009; Kaimio et al., 2013; Peippo et al., 2009; Schenk et al., 2006).

En la técnica de SOV para la producción de embriones está bien definido que las inseminaciones se deben hacer 24 y 12 h antes de la ovulación, ya que este régimen es el óptimo para producir la mayor cantidad de embriones transferibles (Roelofs et al., 2006). Sin embargo, existen limitantes como son la detección de celo, el número de ovulaciones y el tiempo entre primera y última ovulación que hacen que este principio mencionado antes sea de muy difícil cumplimiento de manera homogénea entre individuos. Es por esta razón que se desarrollaron protocolos de SOV en los que se incluyen inductores de la ovulación como GnRH o LH-p lo que permite realizar las inseminaciones a tiempo fijo (IATF) con semen convencional (no sexado) de forma bastante precisa con respecto al momento de ovulación, situando este evento a las 12 y 24 hs de aplicado el inductor de la ovulación (Barros & Nogueira, 2001; Bó, Baruselli, Chesta, & Martins, 2006).

No obstante, el proceso de sexado y crio conservación de espermatozoides produce cambios en las estructuras de los mismos que reducen su tiempo de vida fértil en el tracto femenino (Dejarnette et al., 2008; Larson et al., 2010; Lu & Seidel, 2004; Maxwell et al., 2004; Peippo et al., 2009; Sartori et al., 2004; Schenk et al., 2006). Por esto es que con semen sexado se debe inseminar en forma lo más sincrónica posible con el momento de ovulación en la hembra, es decir que la IA se tiene que realizar lo más cerca del momento de la ovulación para alcanzar mejores tasas de fertilización. Esto se ha logrado en general alargando el tiempo entre remoción de dispositivo intravaginal y la inseminación a tiempo fijo (Sales et al., 2011; Schenk et al., 2006). A pesar de esto hay muy poca información relativa a cual sería precisamente el momento más adecuado para realizar la inseminación con semen sexado en vacas superovuladas.

Recientemente se ha realizado un estudio en vacas superovuladas que ha intentado precisar mejor el momento de la inseminación artificial con semen sexado retrasando la IATF alrededor de 6hs con respecto a lo que se hace con semen convencional (Soares et al., 2011). En este estudio, a un grupo de hembras se le realizó la IATF con semen convencional (20×10^6 espermatozoides / inseminación) a las 12 y 24hs de aplicado el inductor de la ovulación LH-p, a un segundo grupo se efectuó la IATF igual que al anterior, pero con semen sexado (4.2×10^6 espermatozoides/ inseminación) y en un tercer grupo, las inseminaciones fueron realizadas a las 18 y 30hs de aplicada la LH-p con semen sexado. En este estudio la cantidad de embriones entre el primer y tercer grupo fue similar y en ambos superior al segundo grupo. Es decir que se logró producir igual cantidad de embriones transferibles con semen convencional que con semen sexado en menores cantidades con el solo hecho de haber retrasado el momento de la IATF.

En nuestro estudio se intentó de ajustar aún más el momento de IATF reduciendo el intervalo entre ambas IATF de 12 a 6hs tratando de ver cuál de los intervalos en estudio sería el óptimo para la fertilización. Para ello, a un grupo de vacas (control) se les realizó la IATF con el régimen usado por Soares et al. (2011) es decir a las 18 y 30hs (IA18/30) de la aplicación del inductor de la ovulación (GnRH), al segundo grupo las IATF se realizaron a las 18 y 24hs (IA18/24) y al tercer grupo a las 24 y 30hs (IA24/30).

En el grupo control se obtuvieron $1,9 \pm 0,6$ embriones transferibles, valor que fue menor que lo encontrado por Soares ($6,4 \pm 3,1$). En el grupo IA18/24 se produjeron $4,1 \pm 1,5$ embriones transferibles lo cual superó a lo obtenido en el grupo control y en el grupo IA24/30 ($1,3 \pm 0,4$). Si bien es cierto que el grupo IA18/24 tuvo ventaja numérica no existió diferencia significativa con los otros dos grupos. Resultados numéricos similares a esta investigación obtuvieron Schenk et al. (2006) y Peippo et al. (2009) con las IATF realizadas con semen sexado a las 12 y 24h después de la detección del celo donde se recuperaron $3,3 \pm 0,9$ y $2,1 \pm 2,7$ embriones transferibles en vacas Angus y Holstein superovuladas respectivamente. Es posible que ésta diferencia de nuestro estudio con el trabajo de Soares et al. (2011) sea debido a que en ese caso se utilizó el doble de espermatozoides sexados (4.2×10^6 / inseminación) que en nuestra investigación (2.1×10^6 / inseminación). Por otra parte, si bien la respuesta superovulatoria en vacas indicas o taurus ha mostrado ser similar (Castro Neto et al., 2005), también ha sido determinado que a una misma dosis de FSH las vacas índicas son más sensibles al estímulo por tener mayor cantidad de folículos disponibles a ovular y esto podría generar entonces en determinadas circunstancias mayor respuesta que las vacas taurus. En nuestro estudio, los niveles de FSH utilizada fueron los mismos utilizados en el trabajo de Castro Neto et al. (2005) en vacas índicas y aunque fueron superiores a los utilizados por Soares et al. (2011), se encuentran en los niveles indicados por Baruselli et al. (2006) para vacas índicas. Todo esto puede haber generado una menor respuesta ovulatoria en nuestro trabajo con respecto a lo obtenido por Soares et al. (2011).

En cuanto a la proporción de embriones transferibles con respecto a las estructuras totales, la IATF realizada a 18/24hs post GnRH mostró el mejor comportamiento sugiriendo que dentro del período de 18/30 hs propuesto por Soares et al. (2011) el período restringido a las primeras 6 hs (18/24) es el que más se aproximaría al momento de ovulación por lo que la IATF debería ser en ese período.

Existen varios factores que podrían afectar los resultados en la tasa de embriones producidos cuando la IATF se realiza con semen sexado. Algunos de los más importantes son el proceso de sexado propiamente dicho y la dosis baja de espermatozoides. En un programa de SOV, tanto en los estudios citados anteriormente como en el presente, se han encontrado similitudes. En general y en promedio se obtienen de 3 embriones transferibles lo que, confirmando lo ya sabido, muestra que el semen sexado sigue siendo menos fértil y produce menor cantidad de embriones transferibles que el convencional. Esto ya fue descrito en un trabajo realizado por Frijters et al. (2009) en IA en el que le atribuye la baja fertilidad del semen sexado a los dos factores antes mencionado: un 8,6% de disminución debido a la baja dosis de espermatozoides y un 5% de disminución debido al proceso de sexado propiamente dicho.

En SOV no existen trabajos que muestren en que porcentaje se afecta la fertilización con cada uno de estos factores. Sin embargo, en el estudio realizado por Schenk et al. (2006) se muestra que inseminando con dosis de semen 2 a 10 veces más altas que las dosis comerciales (2 vs 10 o 20×10^6 espermatozoides/IA) no se mejora en forma significativa la cantidad de embriones transferibles aun cuando numéricamente siempre hay más embriones cuanto más espermatozoides se utilizan (la alta dispersión en los valores de esta variable puede ser una de las razones; el coeficiente de variación supera el 50% en todos los casos). Sin embargo, el momento de IA aparece como trascendente ya que cuando se hacen 2 IA la cantidad de embriones producidos fue más alta que con

una inseminación y esto fue similar para vacas inseminadas con semen no sexado o sexado. En la vaca SOV hay trastornos en el transporte de espermatozoides que se traduce en 20% menos de ovocitos fertilizados que en vacas no SOV (Donaldson, 1985). Esto es más notorio cuando el semen por sí mismo tiene menor vida media y capacidad fertilizante cuando por el hecho de haber sido sexado.

Soares et al. (2011) demostraron que las inseminaciones con semen sexado en vacas SOV se deben hacer más tarde que con el semen convencional ya que ese retraso acercaría de forma más eficiente la deposición de los espermatozoides con el momento de las múltiples ovulaciones. Nuestro estudio intentaba proponer una ventana menor dentro de la cual realizarlas inseminaciones. Los resultados de este trabajo no muestran en principio que ninguno de los dos momentos alternativos propuestos sean mejores que el señalado por Soares et al. (2011). La alta variabilidad de los resultados, así como el bajo número de las vacas tratadas no permiten poner en evidencia diferencias significativas en los valores encontrados. Sin embargo, resulta sugestivo que la cantidad de embriones transferibles en el grupo control (IA18/30= 1,9) es casi igual a la media de la cantidad de embriones transferibles obtenidos en los otros dos grupos (IA18/24 + IA24/30 /2= 2,7) producto de una menor cantidad en el grupo 24/30 con respecto a una mayor en el grupo 18/24 (duplica largamente al anterior, 4,1 vs 1,3). De todas maneras y si nuestros resultados pudiesen confirmarse con una mayor casuística esto podría a su vez confirmar que la aplicación de GnRH produce una sincronización de la ovulación más ajustada dentro del horario 18/24.

Otra razón que puede conspirar para encontrar alguna diferencia en estos resultados proviene del hecho que las vacas con mayor respuesta ovulatoria tienden a ovular más temprano y durante un período más largo que aquellas con menor respuesta (Bo et al., 2006). Por ello, y en función de esto, tal vez la elección del momento más apropiado para la inseminación debería hacerse de acuerdo a la cantidad de folículos preovulatorios que se detecten el día de la IA.

En conclusión, el bajo número de vacas en cada grupo y la variabilidad en la respuesta entre animales, así como la baja fertilidad del semen sexado no permite evidenciar diferencias reales entre los grupos estudiados. Sin embargo y a pesar de que el ajuste realizado en el intervalo entre inseminaciones de 12 a 6hs en vacas Holstein en producción no mostró una mejoría significativa en la cantidad embriones transferibles, el período entre 18 y 24 hs apareció como el más apropiado lo cual debería ser confirmado aumentando la casuística con estudios similares. Al mismo tiempo sería interesante relacionar estos estudios con la tasa ovulatoria ya que según las respuestas estos momentos de IATF podría modificarse.

BIBLIOGRAFÍA

- Barros, C., Nogueira, MF. 'Embryo transfer in cattle'. *Theriogenology*, 2001, vol. 56, no. 9, p.1483–1496.
- Baruselli, P.S., De Sá Filho, M.F., Martins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F.G., Barros, C.M., Bó, GA. 'Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle'. *Theriogenology*, 2006, vol. 65, no. 1, p.77–88.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S., Chesta, P.M., Martins, C.M. 'The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle'. *Theriogenology*, 2006, vol. 65, no. 1, p.89–101.

- Castro Neto, A.S., Sanches, B.V., Binelli, M., Seneda, MM., Perri, S.H., Garcia, J.F. 'Improvement in embryo recovery using double uterine flushing'. *Theriogenology*, 2005, vol. 63, no. 5, p.1249–1255.
- Dejarnette, J.M., Nebel, R.L., Marshall, C.E., Moreno, J.F., McCleary, C.R., Lenz, R.W. 'Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows'. *Journal of Dairy Science*, 2008, vol. 91, no. 5, p.1778–1785.
- DeVries, A., Overton, M., Fetrow, J., Leslie, K., Eicker, S., Rogers, G. 'Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry'. *Dairy Science*, 2008, vol. 91, no. 2, p.874–856.
- Donaldson, L.E. 'Effect of insemination regimen on embryo production in superovulated cows'. *Veterinary Record*, 1985, vol. 117, no. 2, p.35–37.
- Frijters, A.C.J., Mullaart, E., Roelofs, R.M.G., Hoorne, R.P. 'What affects fertility of sexed bull semen more , low sperm dosage or the sorting process?'. *Theriogenology*, 2009, vol. 71, p.64–67.
- Hasler, J.F., Cardey, E., Stokes, J.E., Bredbacka, P. 'No- nelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment'. *Theriogenology*, 2002, vol. 58, p.1457–1469.
- Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A., Aoyagi, Y. 'Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm'. *Theriogenology*, 2009, vol. 71, p.68–73.
- Kaimio, I., Mikkola, M., Lindeberg, H., Heikkinen, J., Hasler, J.F., Taponen, J. 'Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows'. *Theriogenology*, 2013, vol. 80, no. 8, p.950–954.
- Larson, J.E., Lamb, G.C., Funnell, B.J., Bird, S., Martins, A., Rodgers, J.C. 'Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional , frozen-thawed semen'. *Theriogenology*, 2010, vol. 73, no. 5, p.698–703.
- Lu, K.H., Seidel, G.E. 'Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm'. *Theriogenology*, 2004, vol. 62, no. 5, p.819–830.
- Maxwell, W.M., Evans, G., Hollinshead, F., Bathgate, R., de Graaf, S., Eriksson, B., Gillan, L, Morton, K., O'Brien, J. 'Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox'. *Animal Reproduction Science*, 2004, vol. 82–83, p.79–95.
- Oses, M.V., Teruel, M.T., Cabodevila, J.A. 'Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro.'. *Revista Veterinaria Universidad Nacional del Nordeste*, 2009, vol. 20, no. 2, p.138–145.
- Peippo, J., Vartia, K., Kananen-Anttila, K., Rätty, M., Korhonen, K., Hurme, T., Myllymäki, H., Sairanen, A., Mäki-Tanila, A. 'Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen'. *Animal Reproduction Science*, 2009, vol. 111, no. 1, p.80–92.
- Roelofs, J.B., Graat, E.A.M., Mullaart, E., Soede, N.M., Voskamp-Harkema, W., Kemp, B. 'Effects of insemination–ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle'. *Theriogenology*, 2006, vol. 66, no. 9, p.2173–2181.
- Sales, J.N.S., Neves, K.A.L., Souza, A.H., Crepaldi, G.A., Sala, R.V., Fosado, M. 'Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm'. *Theriogenology*, 2011, vol. 76, no. 3, p.427–435.
- Sartori, R., Souza, A.H., Guenther, J.N., Caraviello, D.Z., Geiger, L.N., Schenk, J.L.,

Wiltbank, M.C. 'Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm', *Animal Reproduction*, 2004, vol. 1, no. 1, p.86–90.

- Schenk, J.L., Suh, T.K., Seidel Jr., G.E. 'Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm', *Theriogenology*, 2006, vol. 65, no. 2, p.299–307.
- Soares, J.G., Martins, C.M., Carvalho, N.A.T., Nicacio, A.C., Abreu-Silva, A.L., Campos Filho, E.P., Torres Júnior, J.R.S., Sá Filho, M.F., Baruselli, P.S. 'Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors', *Animal Reproduction Science*, 2011, vol. 127, no. 3, p.148–153.
- Tubman, L.M., Brink, Z., Suh, T.K., Seidel, G.E., Tubman, L.M., Brink, Z., Suh, T.K., Seidel, G.E. 'Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry / cell sorting', *Journal of animal science*, 2004, vol. 82, no. 4, p.1029–1036.
- Underwood, S.L., Bathgate, R., Maxwell, W.M.C., Evans, G. 'In vitro characteristics of frozen-thawed, sex-sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 37 °C', *Theriogenology*, 2009, vol. 72, no. 7, p.1001–1008.

REDVET: 2018, Vol. 19 N° 4

Este artículo Ref. 041811_RED VET (Ref. prov. 181805_ajuste, Recibido 02/02/18, Aceptado 07/03/2018, Publicado 01/04/2018) está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040418.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040418/041811.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

