

# Porcentaje de preñez en vaquillonas Angus inseminadas a tiempo fijo con semen sexado o convencional

Butler, H.M.<sup>(1)</sup>; Cesaroni, G.J.C.<sup>(1)</sup>; Butler, A.<sup>(1)</sup>, Etcheverry, E.<sup>(1)</sup>; Becker, B.<sup>(2)</sup> y Alberio, R. H.<sup>(3)</sup>

(1) Sincrovac SH [sincrovac@arnetbiz.com.ar](mailto:sincrovac@arnetbiz.com.ar)

(2) Laboratorio Zoovet [brianb@zoovet.com.ar](mailto:brianb@zoovet.com.ar)

(3) INTA Balcarce: [ralberio@balcarce.inta.gov.ar](mailto:ralberio@balcarce.inta.gov.ar)

Recibido: 14 de octubre de 2010.

## Resumen

*El objetivo del presente trabajo fue comparar la preñez a la IATF de vaquillonas inseminadas una vez con semen convencional y una o dos veces con semen sexado.*

*Se utilizaron 314 vaquillonas Angus ginecológicamente aptas, de 2 años de edad y con un estado corporal de 3,7 (rango 1 a 5) se las trató con dispositivos conteniendo 0,5 g de progesterona (DIB 0,5 Syntex®) y 2 mg de benzoato de estradiol (Benzoato de Estradiol Syntex®). A los 8 días, los dispositivos fueron retirados aplicándose simultáneamente 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn Syntex®) y 150 µg de Cloprostenol DL (Ciclase Syntex®). Previo a la IATF, las vaquillonas fueron asignadas al azar a tres grupos: 1) Semen sexado (SEXADO X1; n=90), inseminadas a las 57 h de retirados los DIB; 2) Semen sexado (SEXADO X2; n=90), inseminadas con semen sexado, a las 49 h y 58 h de retirados los DIB y 3) Semen convencional (SC, n=134) inseminadas con semen sin sexar a las 51 hs de retirados los DIB. Los porcentajes fueron comparados por medio de la prueba del chi cuadrado.*

*No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en los porcentajes de preñez entre los grupos sexado X 1 (35, 6%) y sexado X 2 (40%), pero sí se encontraron diferencias ( $P < 0,05$ ) entre los grupos inseminados con semen sexado (37,8%) ó convencional (54, 5%).*

*En conclusión, la inseminación con semen sexado disminuye la proporción de vaquillonas preñadas después de una IATF respecto al convencional. Además, realizar una doble inseminación con semen sexado no mejora los resultados con respecto a una sola inseminación.*

*Palabras clave: Vaquillonas; Angus; Semen sexado; IATF;*

**Heifers pregnancy rate in a fixed time AI with sex sorted sperm at 49 and 58 hr or 59 hours**

**Summary**

*The aim of this assay was to compare TAI pregnancy rate in heifers inseminated once with non sorted sperm or once and twice with sex sorted sperm . The experiment was carried out with 314 Angus heifers, two years old and with a body condition of 3.7 (scale 1 to 5).*

*At day 0, heifers were treated with a 0.5g progesterone device (DIB 0,5 Syntex®) and injected with 2 mg estradiol benzoate (Benzoato de Estradiol Syntex®). At day 8, the devices were removed, heifers were injected with 0.5 mg of estradiol cipionate (Cipiosyn Syntex®) and 150 µg de Cloprostenol DL (Ciclase Syntex®) and randomly assigned to three groups:*

*1) Sexed X1; (n=90), heifers inseminated with sex sorted sperm at 59 hours after withdraw; 2) Sexed X2; (n=90), heifers inseminated with sex sorted sperm at 49hr and 58 hr after withdraw and 3) normal semen (n=134), heifers inseminated with non sorted sperm at 51 hours after withdraw. The results were statistically checked by the Chi Square test.*

*There were not statistical differences between pregnancy rate of Sexed X1(35,56%) and Sexed X2(40%) group respectively ( $P > 0,05$ ). The non sorted semen group has a high statistically pregnancy rate (54,48%) ( $p < 0.05$ ) against X1 and X2.*

*In summary, sex sorted sperm used at TAI decrease the pregnancy rate compared with the non sorted sperm and twice inseminations with sex sorted semen at 48hr and 58 hr didn't improve pregnancy rate against once at 59hr.*

*Key words: Heifers; Angus; Sex sorted sperm; TAI*

## **Introducción**

La utilización de semen sexado beneficia a la producción lechera porque permite tener una muy alta proporción de gestaciones hembra, en el ganado para carne posibilita alcanzar el objetivo que se haya planteado, como podría ser, a modo de ejemplo, producir más reproductores machos.

Por otra parte, la implementación de la inseminación artificial a celo detectado es cada día menos viable razón por la cual, los tratamientos hormonales para inducir ovulación sincronizada que permiten realizar una inseminación a tiempo prefijado (IATF) han tenido una enorme aceptación. Hoy en día, ésta es una biotecnología que ha logrado aumentar el uso de la inseminación de manera significativa, entre otras razones por evitar la problemática de la detección de celos y por mejorar diferentes variables en la producción de carne.

El proceso de separación de las gametas X e Y implica una serie de procesos que causan daño celular. Entre estos procesos se encuentran las altas diluciones (Ballester et al., 2007), las tinciones del núcleo, las altas temperaturas de incubación, las fuerzas mecánicas asociadas al pasaje por el citómetro de flujo, la exposición a un laser de luz ultravioleta y las altas presiones (Mawell y Johnson, 1999, Rath et al, 2009). Así mismo, debido a la limitada eficiencia de producción del semen sexado ( $1 \times 10^6$  espermatozoides/hora; Seidel, 2007), es que una dosis comercial del mismo tiene en general muy baja concentración espermática ( $1$  a  $3 \times 10^6$  espermatozoides) mientras que una dosis de semen convencional –sin sexar- cuenta como mínimo con  $15$  a  $20 \times 10^6$  espermatozoides (Frijters et al, 2009).

La fertilidad del semen depende en gran medida del reproductor y en general se acepta que esta no cambia con dosis de  $10 \times 10^6$  de espermatozoides totales pero sólo algunos reproductores mantienen su fertilidad con dosis de  $2 \times 10^6$  de espermatozoides totales (Seidel, 2007).

Por lo arriba mencionado es de esperar que los porcentajes de preñez a la inseminación, tanto a celo detectado como a tiempo fijo, sean menores cuando se utiliza semen sexado que cuando se utiliza semen convencional. La tasa de preñez con semen sexado está entre  $10$  a  $30$  puntos porcentuales por debajo de las obtenidas con semen convencional (Seidel et al. 1999 Seidel y Schenk, 2007; Schenk et al. 2009).

Por consiguiente el presente trabajo tuvo por objetivo evaluar si una doble IATF con semen sexado mejora los porcentajes de preñez obtenidos con una sola IATF e igualan los niveles obtenidos con una dosis de semen sin sexar.

## **Materiales y métodos**

### *Semen*

Para este trabajo el semen utilizado (sexado y convencional) fue del mismo reproductor y provino del Centro de Investigaciones Reproductivas Pérez Compañc, Goyaike, Ea. San Joaquín.

Ambos tipos de semen fueron evaluados antes de su uso, presentando características macroscópicas muy similares y sólo difiriendo en la cantidad de espermatozoides por dosis (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tipo de semen y sus características principales a la descongelación.

<b>Tipo de semen</b>	<b>Sexado</b>	<b>Convencional</b>
<b>Espermatozoides totales</b>	3.000.000	30.000.000
<b>Motilidad individual progresiva</b>	60%	60%
<b>Vigor (0-5)</b>	3	4

### *Animales y diseño experimental*

Se utilizaron 316 vaquillonas Angus de 2 años de edad con un estado corporal de 3,7 (rango 1 a 5) y en las que se realizó palpación transrectal para evaluar su aptitud reproductiva. Se consideró, apta a aquella vaquillona que tuviese un buen desarrollo uterino, al menos un ovario mayor a 1,5 x 2 cm y estructuras palpables. De las 316 vaquillonas, 314 fueron consideradas ginecológicamente aptas. Estas fueron tratadas con un dispositivo intravaginal con 0,5 gr de progesterona (DIB 0,5 Syntex ®) y una inyección de 2 mg de benzoato de estradiol (Benzoato de Estradiol Syntex ®). A los 8 días los dispositivos fueron retirados aplicándose simultáneamente 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn Syntex ®) y 150 µg de Cloprostenol DL (Ciclase Syntex ®)

Previo a la IATF, las vaquillonas fueron asignadas al azar a tres grupos:

- 1- *Sexado X 1* (n=90) inseminadas una sola vez con semen sexado a las 59 h de retirados los DIB
- 2- *Sexado X 2* (n=90) inseminadas con semen sexado dos veces, a las 49 h y 58 h de retirados los DIB
- 3- Convencional (n=134) inseminadas una sola vez con semen sin sexar a las 51 h de retirados los DIB.

### *IATF*

La IATF fue realizada por un mismo profesional. El semen sexado fue descongelado a 35° durante 30” y el convencional a 37 ° durante 30”.

#### *Diagnóstico de gestación*

El diagnóstico de gestación fue realizado por medio de ultrasonografía (Aloka 500) a los 33 días de haberse realizado la IATF.

#### *Análisis estadístico*

El análisis estadístico, se hizo usando modelos lineales generalizados usando una distribución binomial fijándose un nivel de  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

La tasa de preñez no difirió entre los grupos de vaquillonas inseminadas con semen sexado ( $P > 0,05$ ), y en ambos casos sus valores fueron significativamente inferiores a los obtenidos con el semen sin sexar ( $P < 0,05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentaje de vaquillonas preñadas en los distintos tratamientos.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PREÑADAS (%)</b>
<b>Sexado X 1 (n: 90)</b>	32 (35,6) <sup>a</sup>
<b>Sexado X 2 (n: 90)</b>	36 (40,0) <sup>a</sup>
<b>Sin sexar (n: 134)</b>	73 (54,5) <sup>b</sup>

\* Números seguidos de letras distintas difieren entre sí  $P < 0,05$ .

### **Discusión**

En el presente trabajo se comparó una doble IATF vs una IATF ambas con semen sexado, y un grupo en que se inseminó a tiempo fijo con semen convencional del mismo reproductor, pero con una dosis inseminante 10 veces mayor. Este es un factor distorsivo ya que el semen sin sexar tiene ambas propiedades, no fue sexado y tiene una mayor cantidad de espermatozoides. Si bien esto impide sacar conclusiones desde el punto de vista de la habilidad fertilizante de uno u otro semen, esto permitió comparar la fertilidad que es posible obtener con las dosis comerciales de uno y otro tipo de semen.

Los espermatozoides sexados, debido a todos los factores físicos a que son sometidos durante su procesamiento, sufren cambios de membrana por lo cual requieren menos tiempo para el proceso de capacitación (Lu et al, 2004). Esto reduce la vida media de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino y por lo tanto hace necesario una coordinación más ajustada entre la IATF y el momento de la ovulación. Por tal razón es que cuando se utiliza semen sexado se propone hacer la IATF, más cerca de la 60 h de haber retirado los DIB (Baruselli et al, 2009) es decir unas 8 a 10 h más tarde de lo usualmente utilizado con semen convencional. El problema que esto trae es de orden práctico, ya que para inseminar a las 60 h es necesario trabajar de noche con todos los inconvenientes que esto acarrea en los establecimientos comerciales. Otra alternativa

que ha sido propuesta, es la de inyectar GnRH previo a la inseminación y postergando ésta algunas horas con respecto a lo mencionado anteriormente (Lagioia y col 2008). Como los resultados de preñez con este esquema fueron similares a los del sistema anterior (IATF a las 60 h), esto permitiría salvar los problemas de logística planteados más arriba.

Los problemas antes mencionados presentes en el espermatozoide debidos al sexado y la congelación, se traducen en general en bajas en la fertilidad cuando son comparados a los obtenidos con semen convencional (de Graff et al, 2009; Frijters et al., 2009; Maxwell et al., 2004). Esto puede ser debido ya sea a daños en el espermatozoide como se mencionó antes que bajarán la tasa de concepción, también a un incremento de pérdidas embrionarias por defectos en el ADN causados por el sexado propiamente dicho, por las bajas dosis inseminantes utilizadas o por otras causas aun no determinadas (Maxwell et al, 2004).

La problemática de la menor fertilidad del semen sexado es una preocupación de aquellos que trabajan en el tema y de hecho existen propuestas para obtener mejores tasas de preñez (Rath et al, 2009). Esta metodología consiste en la utilización de un medio de dilución y congelación desarrollado comercialmente (Sexcess ®) que aparentemente protege en mayor grado la sobrevivencia y la calidad espermática. Antes fue mencionado también la modificación del momento de inseminación como forma de sincronizarlo mejor con el momento de ovulación.

Otra alternativa que ha sido explorada, teniendo en cuenta la menor vida media de los espermatozoides sexados, ha sido la de depositar el semen más allá del cuerpo uterino (inseminación profunda). Esto ha producido resultados controvertidos hasta el presente ya que se han observado casos en los que no ha habido mejoras significativas de la fertilidad (Kurykin et al., 2007, Seidel y Schenk, 2008), otros en los que incluso se han observado disminuciones en la misma (Seidel y Schenk, 2008), pero también se han obtenido resultados en los que la fertilidad ha sido ligeramente mejorada (Brogliatti et al. 2009) y en el que la combinación de lugar de deposición del semen y el momento de IATF parecen tener una fuerte relación. Hasta el presente, esta metodología no parece entonces ser una modalidad repetible ni confiable hasta no definir las condiciones en que pueda producir mejoras en forma consistente.

En síntesis, este trabajo permite concluir que, en condiciones de rodeos comerciales, implementando IATF con semen convencional, se logra una tasa de preñez del orden del 50 %, mientras que con semen sexado la misma estaría en el orden del 35 %. No obstante, en este último valor la bibliografía revela amplias variaciones. Estas diferencias en la tasa de preñez, en el costo de la pajueta, en la dificultad que implica la decisión del momento óptimo de inseminación, etc. son todos factores que el empresario deberá evaluar para considerar la conveniencia o no de su utilización en bovinos para carne.

Sería importante continuar realizando trabajos de estas características, incorporando en el grupo experimental hembras inseminadas con semen convencional, utilizando la misma dosis inseminante que la que contenga el semen sexado para mejorar la información en cuanto a habilidad fertilizante del semen sexado.

## **Bibliografía**

1. Ballester, J., Johannisson, A., Saravia, F., Haard, M., Gustafsson, H., Bajramovic, D., Rodriguez-Martinez, H. Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm numbers. *Theriogenology* 68 (2007) 934–943

2. Baruselli, P.S., de Souza, H., C. De Melo Martins, J. N. De Sousa Sales, G. Armond Crepaldi, M. F. De Sá Filho. Programas de iatf con semen sexado. VIII simposio internacional de reproduccion animal - IRAC 2009.
3. Brogliatti, G., Domínguez, M., Lusenhoff, J., Perkins, G., Bo, G. Deep intracornual fixed time artificial insemination using sexed semen in holstein heifers. *Reproduction, fertility and development.* (2010) 22: 165
4. de Graaf, S.P., Beilby, K.H., Underwood, S.L., Evans, G., Maxwell, W.M.C.. Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. *Theriogenology* 71 (2009) 89–97.
5. Frijters, A.C.J., Mullaart, E., Roelofs, R.M.G., van Hoorne, R.P., Moreno, J.F., Moreno, O., Merton, J.S.. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 71 (2009) 64–67
6. Garner, D. L. Sex-Sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *Journal of Andrology*, Vol 22, Issue 4 519-526,
7. Kurykin, J., Jaakma, U., Jalakas, M., Aidnik, M., Waldmann, A., Majas, L. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology* 67 (2007) 754–759
8. Lagioia, J.J.; Loguercio, J.E.; Young, S.; Basualdo, M.; Feula, P.; Santarena, A.; Panarace, M. y Medina, M.P. 2008. *Taurus, Bs. As.*, 10(39):22-25.
9. Lu, K.H., Seidel Jr, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminate with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v.62, p.819-830 (2004)
10. Maxwell, W.M.C., Johnson, L.A., 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52, 1353–1362.
11. Maxwell, W.M.C, Evans, G., Hollinshead, F.K., Bathgate, R., de Graaf, S.P., Eriksson, B.M., Gillan, L., Morton, K.M., O'Brien, J.K.. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science.* July 2004 Vol. 82, Issue , Pages 79-95
12. Rath, D., Moench-Tegeder, G., Taylor, U., Johnson, L.A. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71 (2009) 22–29.
13. Schenk, J.L., Cran, D.G., Everett, R.W., Seidel Jr, G.E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting *Theriogenology* 71 (2009) 717–728
14. Seidel, G.E. Jr, Schenk, J.L., Herickhoff, L.A., Doyle, S.P., Brink, Z., Green, R.D. and Cran, D.G. Insemination Of Heifers With Sexed Sperm. *Theriogenology* 52:1407-1420, 1999
15. Seidel, G.E. Jr. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68 (2007) 443–446
16. Seidel, G.E. Jr., Schenk, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science* 105 (2008) 129–138.