

# 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

Rosatti, G. N.<sup>(1)</sup>, Aller, J. F.<sup>(2)</sup>, Vittone, J. S.<sup>(3)</sup>, Callejas, S. S.<sup>(4)</sup>, Alberio, R. H.<sup>(2)</sup>

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una o dos inseminaciones con dosis reducidas de espermatozoides depositados en el cuerno ipsilateral al ovario con folículo dominante (FD) sobre la tasa de gestación (TG). Se utilizaron 177 vacas con cría, multíparas (rango posparto: 35-94 días), de las razas Hereford y Braford de dos establecimientos. Las vacas fueron tratadas con un dispositivo intravaginal con progesterona durante 8 días para sincronizar e inducir celo/ovulación e inseminadas artificialmente a tiempo fijo (IATF). A las 24 hs de retirado el dispositivo, se realizó ecografía ovárica por vía transrectal para determinar el ovario con FD. Se utilizó el semen de dos toros. De un eyaculado de cada toro se procesaron (congelación) pajuelas de 0,5 ml con dosis reducida de espermatozoides (DRE=5 x 10<sup>6</sup> totales) y con dosis convencional (DCE=25 x 10<sup>6</sup> totales). Las vacas fueron distribuidas en cuatro tratamientos (T); T1 (control) (n=47): IA en el cuerpo del útero con DCE, T2 (n=45): IA en el cuerpo del útero con DRE, T3 (n=43): IA en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con FD con DRE y T4 (n=42): doble IA en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con FD con DRE. Todas las IATFs se realizaron a las 54-56 hs después de retirado el dispositivo y la segunda IATF del T4 se realizó 16 hs más tarde. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía a los 35 días después de la IATF. La TG del T3 (58,1%) no difirió (P>0,05) de la TG del T4 (42,9%), pero fue significativamente mayor (P<0,05) que la TG del T1 (38,3%) y del T2 (28,9%). Sin embargo, la TG del T4 no difirió (P>0,05) de la TG del T1 y del T2. Se puede concluir que una IATF combinada con una DRE depositados en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con FD mejora la TG respecto a la obtenida con una IATF convencional.

**Palabras clave:** vacas para carne; IATF; semen; inseminación intracornual; tasa de gestación.

(1) EEA INTA Reconquista, Santa Fe.

(2) EEA INTA Balcarce, Buenos Aires.

(3) EEA INTA Concepción del Uruguay, Entre Ríos.

(4) Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA).

grosatti@correo.inta.gov.ar

Recibido: 12 de agosto de 2012.

Aceptado: 23 de agosto de 2012.

Taurus Año 14 N° 56: 18-23

## Effect of low-sperm number combined with fixed-time deep cornual insemination on pregnancy rate in progesterone-treated beef cows

### Summary

The aim of the study was to evaluate effect of single and double fixed-time artificial insemination into the uterine horn ipsilateral to the ovary bearing the dominant follicle (DF), combined with low dose spermatozoa in beef cows upon the pregnancy rate (PR). A total of 177 suckled cows (Hereford and Braford, multiparous, postpartum range: 35-94 days) from two farms were used. The cows were treated with a progesterone intravaginal device during 8 days and were fixed-time artificially inseminated (FTAI). Ultrasonography was used to identify the DF (presumptive ovulatory follicle) 24 h after device removal. The semen of two bulls was used. One ejaculate from each bull was split into two spermatozoa concentrations: 5 (LD: low dose) and 25 (SD: standard dose) million spermatozoa per dose (0.5 ml straws). The straws were then frozen in a programmable freezing machine. The animals were assigned to four treatments (T); T1 (control) (n=47): FTAI into the uterine body with SD, T2 (n=45): FTAI into the uterine body with LD, T3 (n=43): FTAI into the uterine horn ipsilateral to the ovary bearing the DF with LD and T4 (n=42): two FTAI into the uterine horn ipsilateral to the ovary bearing the DF with LD. Cows were inseminated 54-56 h after device removal. The second FTAI of T4 was performed 72 h after device removal. Pregnancy was diagnosed by ultrasound at 35 days after FTAI. Pregnancy rate was higher ( $P < 0.05$ ) for the T3 (58.1%) than T1 (38.3%) and T2 (28.9%), but it was not higher ( $P > 0.05$ ) than T4 (42.9%). Nevertheless, the PR did not differ ( $P > 0.05$ ) among T1, T2 and T4. It is concluded that a single FTAI into the uterine horn ipsilateral to the ovary bearing the DF combined to LD spermatozoa in suckling cows is more efficient than a FTAI into uterine body with LD or SD and it is equally efficient than double FTAI into the uterine horn ipsilateral to the ovary bearing the DF with LD sperm.

**Key words:** beef cattle; FTAI; semen; intracornual insemination; pregnancy rate.

## Introducción

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) es una biotécnica utilizada en los establecimientos dedicados a la cría bovina y numerosos esfuerzos están dirigidos a aumentar su eficiencia. 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. La producción de semen congelado sería más eficiente si se aumentara la cantidad de dosis por eyaculado. En consecuencia, el valor de mercado de la dosis de semen proveniente de toros genéticamente sobresalientes podría reducirse y la producción de carne beneficiarse.

Varios estudios han demostrado que la deposición del semen cercana a la unión útero-tubárica en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con folículo preovulatorio combinada con un bajo número de espermatozoides, puede ser una alternativa para obtener una mayor<sup>(23, 24)</sup> o similar<sup>(12)</sup> tasa de gestación que la obtenida con un número convencional de espermatozoides (15 a 30 millones) depositados en el cuerpo uterino. Esta deposición profunda de semen, evita las barreras naturales a las que se exponen los espermatozoides en el proceso de la inseminación convencional y mejora su capacidad fertilizante<sup>(9)</sup>. Esto es particularmente importante con el uso de tratamientos hormonales para IATF, en donde el tiempo promedio y la

dispersión desde el retiro del dispositivo hasta la ovulación varía según el tratamiento utilizado. Por lo tanto, este intervalo promedio es de aproximadamente 50 a 68 hs con un rango de 36 a 108 hs<sup>(2, 14, 17, 25)</sup>. Esta dispersión en la ovulación adquiere especial importancia con los espermatozoides sometidos a la congelación-descongelación en donde, debido a ello, sufren cambios en la membrana plasmática similares a la capacitación natural, lo que explicaría la disminución de la vida media comparada con la de los espermatozoides sin congelar<sup>(3)</sup>.

Otra alternativa que facilitaría el uso de una dosis reducida de espermatozoides podría ser la doble inseminación con un intervalo de 12 a 18 hs, de manera de mantener espermatozoides fértiles en el tracto reproductor femenino durante el rango de ovulaciones. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de una o dos inseminaciones con dosis reducidas de espermatozoides depositados en el cuerno ipsilateral al ovario con folículo dominante sobre la tasa de gestación obtenida después de un tratamiento con progestágeno para inducir el celo/ovulación e IATF.

## Materiales y Métodos

### 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.

### **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  $\mu$ g 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 eyaculado de cada toro se procesaron (congelación) pajuelas de 0,5 ml con dosis reducida de espermatozoides (DRE=5 x 10<sup>6</sup> totales) y con dosis convencional (DCE=25 x 10<sup>6</sup> totales). Las pajuelas con ambas dosis de espermatozoides y de cada toro presentaron un mínimo de 45% de motilidad progresiva rectilínea y 55% vivos (eosina-nigrosina) pos-descongelación (37 °C/1 minuto).

### **Estudios ecográficos**

A las 24 horas (día 9) de retirado el DIB se realizó ecografía ovárica por vía transrectal (FALCO VET 100, 6-8 MHz) para determinar el ovario con el folículo de mayor tamaño presuntamente dominante (FD). En una muestra al azar (EEA1, n=51) y en la totalidad (EEA2, n=55) de las vacas, se midió el diámetro del FD.

Al momento de la IATF (Día 10) se determinó la presencia o ausencia del FD (ovulación pre-IATF). Por lo tanto, el momento de ovulación se definió como antes o después de la IATF.

La ovulación se confirmó por medio de ecografía 10 días después de la IATF por la presencia de un cuerpo lúteo. El diagnóstico de gestación se realizó por medio de ecografía a los 35 días de la IATF.

### **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: presencia de alteraciones y/o lesiones del aparato reproductor, pérdida del DIB y FD no observado al día 9. Tras la aplicación de estos criterios, 20 vacas 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 cada 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). La CC presentó un rango entre 2 y 6, en la escala de 1 a 9<sup>(8)</sup> y el IPT fue de 62,9 $\pm$ 14,2 días (promedio $\pm$ EEM) con un rango de 35 a 94 días.

### **Análisis estadístico**

Las variables IPT, CC, tratamientos y EEA (incluye el toro y la raza de vacas) se consideraron fuentes de variación de la tasa de gestación (TG). Por lo tanto, la TG fue analizada mediante un modelo lineal generalizado para distribución binomial (PROC GENMOD). Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por medio de contrastes con la prueba Chi-cuadrado (PROC GENMOD). El diámetro del FD al día 9 (n=106) fue analizado mediante un modelo lineal generalizado para distribuciones normales (PROC GLM) y la tasa de gestación según el momento de ovulación (antes o después de la IATF) se com-

paró por medio de la prueba Chi-cuadrado (PROC GENMOD). El programa estadístico utilizado en todos los procedimientos fue el SAS (1998) (20). Todos los efectos y las diferencias se consideraron significativas con un  $P < 0,05$ .

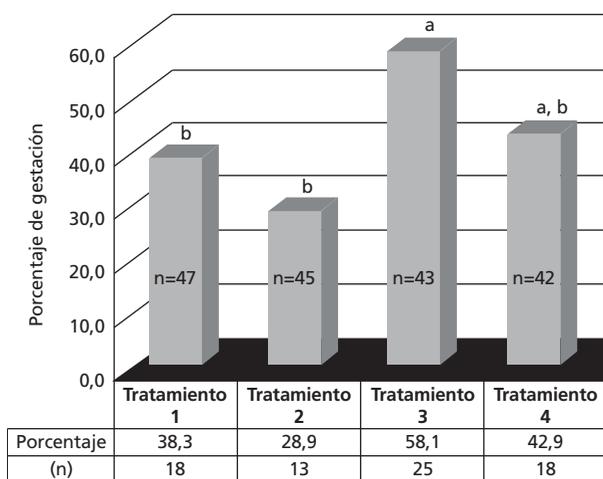
## Resultados

La TG no fue afectada por la EEA, la CC y el IPT, sin embargo las diferencias entre tratamientos fueron significativas ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1). 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.

El porcentaje de vacas que ovuló antes de la IATF fue de 31,1% (33/106) y que ovuló después fue de 68,9% (73/106). Las vacas que ovularon antes de la IATF presentaron un mayor ( $P = 0,02$ ) diámetro promedio del FD ( $11,9 \pm 0,4$  mm) al día 9 que las vacas que ovularon después de la IATF ( $10,8 \pm 0,2$  mm).

La tasa de gestación de las vacas que ovularon antes de la IATF [24,2% (8/33)] fue menor ( $P = 0,01$ ) que la tasa de gestación de las vacas que ovularon después de la IATF [50,7% (37/73)].

**Figura 1.** Tasa de gestación (vacas preñadas/vacas ovuladas) para los diferentes tratamientos



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

## Discusión

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) (10). Los resultados del presente estudio

demuestran que una IATF realizada en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con folículo dominante, combinada con un bajo número de espermatozoides 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 (13, 22), 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) (11). Sin embargo, en otros trabajos no se encontraron diferencias ni en la tasa de fecundación (7) ni en la tasa de gestación (16) al comparar ambos sitios de deposición. 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 y no cuando la deposición es realizada cerca de la unión utero-tubárica, debido a que gran parte de los espermatozoides podrían perderse por el movimiento retrógrado hacia la vagina (6, 7, 15). Por otro lado, la tasa de gestación de una 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 y col. (1) 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 y col. (11), 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  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Sin embargo, Williams y col. (26) sugirieron que la IA intracornual profunda no produce lesiones ni contaminación bacteriana en el endometrio.

Las vacas que ovularon antes de la IATF presentaron un menor porcentaje de preñez que las

vacas que ovularon después de la IATF. Estos resultados son similares a los informados por Sá Philo y col.<sup>(19)</sup>. 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 de los ovocitos como preparación a la fecundación, debido a que los espermatozoides tardan hasta 12 hs en su recorrido desde el cuerpo del útero hasta el sitio de fertilización<sup>(21)</sup>. Además, los espermatozoides sufren un retardo temporario en el istmo caudal antes de continuar hacia la ampolla del oviducto<sup>(10)</sup>. Por otro lado, Dalton y col.<sup>(4)</sup> determinaron que una inseminación tardía aumenta la tasa de embriones de mala calidad, posiblemente debido al envejecimiento del ovocito.

Los resultados de este trabajo y lo anteriormente mencionado, estarían indicando que la inseminación debería realizarse antes de la ovulación, como refieren los trabajos de IA<sup>(4,5)</sup> luego de la detección de celo natural espontáneo. De modo similar, en un estudio con vacas que fueron tratadas con un protocolo Ovsynch (GnRH/PGF $\alpha$ /GnRH) e inseminadas en distintos momentos después de la segunda inyección de GnRH (la ovulación se produce entre 24 y 32 hs después de la GnRH) reveló que la tasa de gestación fue mayor cuando la IA se realizó entre 0 y 24 hs que cuando se realizó a las 32 hs después de la segunda GnRH<sup>(18)</sup>.

En el presente trabajo, las vacas que ovularon antes de la IATF presentaron un mayor diámetro del FD al día 9, por lo tanto, este parámetro podría ser considerado para decidir el momento de la IATF. Deberían realizarse estudios tendientes a evaluar si las vacas con un FD con mayor diámetro en el día 9 mejoran la fertilidad cuando son inseminadas 6 a 8 horas antes respecto al intervalo convencional.

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 del FD por palpación rectal o ecografía 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.

## Conclusión

Los resultados de este trabajo demuestran que es posible realizar una IATF con una dosis reducida de espermatozoides en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con folículo dominante y mejorar la tasa de gestación obtenida con una IATF convencional. 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.

## Agradecimientos

Al Centro de Inseminación Artificial de Oeste (CIIADO) y al Centro Litoral de Inseminación Artificial (CLIA) por el procesamiento de las dosis de semen. También se agradece al personal de ambas EEA del INTA por la colaboración en el trabajo de campo.

## Bibliografía

1. Andersson, M., Taponen, J., Koskinen, E. and 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.
2. Avilés, M., Cutaia, L., Peres, L. C., Pincinato, D., Maraña Peña, D., Balla, E., Videla Dorna, I. and Bó, G. A. 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. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 2005 p 383.
3. Bailey, J. L., Bilodeau, J.-F. and Cormier, N. 2000. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *J. Androl.* 21:1-7.
4. Dalton, J. C., Nadir, S., Bame, J. H., Noftinger, M., Nebel, R. L. and Saacke, R. G. 2001. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 84:2413-2418.
5. Dransfield, M. B. G., Nebel, R. L., Pearson, R. E. and Warnick, L. D. 1998. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J. Dairy Sci.* 81:1874-1882.
6. Gallagher, G. R. and Senger, P. L. 1989. Concentrations of spermatozoa in the vagina of heifers after deposition of semen in the uterine horns, uterine body or cervix. *J. Reprod. Fertil.* 86:19-25.
7. Hawk, H. W. and Tanabe, T. Y. 1986. Effect of unilateral

- cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *J. Anim. Sci.* 63:551-560.
8. Herd, D. B. and Sprott, L. R. 1996. Body condition, nutrition and reproduction of beef cows. *Texas Agricultural Extension Service B-1526*:1-12.
  9. Hunter, R. H. F. 2003. Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 79:157-170.
  10. Hunter, R. H. F. and Wilmot, I. 1984. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 24:597-608.
  11. Kurykin, J., Jaakma, Ü., Majas, L., Jalakas, M., Aidnik, M., Waldmann, A. and Padrik, P. 2003. Fixed time deep intracornual insemination of heifers at synchronized estrus. *Theriogenology* 60:1261-1268.
  12. Kurykin, J., Jaakma, Ü., Waldmann, A., Jalakas, M., Aidnik, M., Majas, L. and Padrik, P. 2006. Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF<sub>2α</sub> treatment or at spontaneous estrus. *Anim. Reprod. Sci.* 95:116-124.
  13. López-Gatius, F. and Camón-Urgel, J. 1988. Increase of pregnancy rate in dairy cattle after preovulatory follicle palpation and deep cornual insemination. *Theriogenology* 29:1099-1103.
  14. Manes, J., Aller, J. F., Callejas, S. S., Hozbor, F. and 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. *Reprod. Dom. Anim.* 47:412-418.
  15. Mitchell, J. R., Senger, P. L. and Rosenberger, J. L. 1985. Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. *J. Anim. Sci.* 61:956-967.
  16. Momont, H. W., Seguin, B. E., Singh, G. and Stasiukynas, E. 1989. Does intrauterine site of insemination in cattle really matter? *Theriogenology* 32:19-26.
  17. Pincinato, D., Peres, L. C., Maraña Peña, D., Borges, L. F. K., Cutaia, L. and Bó, G. A. Inicio de onda y ovulación en vacas con cría al pie tratadas con distintos protocolos de sincronización de la ovulación utilizando dispositivos con progesterona. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 2005 p 416.
  18. Pursley, J. R., Silcox, R. W. and 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. *J. Dairy Sci.* 81:2139-2144.
  19. Sá Filho, M. F., Crespilho, A. M., Santos, J. E. P., Perry, G. A. and Baruselli, P. S. 2010. 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. *Anim. Reprod. Sci.* 120:23-30.
  20. SAS: Statistical Analysis System. SAS/STAT® User's Guide. 14 Th ed., Cary, NC, SAS Inst. Inc., 1998 pp 846.
  21. Scott, M. A. 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim. Reprod. Sci.* 60:337-348.
  22. Senger, P. L., Becker, W. C., Davidge, S. T., Hillers, J. K. and Reeves, J. J. 1988. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 66:3010-3016.
  23. Verberckmoes, S., Van Soom, A., De Pauw, I., Dewulf, J., Vervaeke, C. and de Kruif, A. 2004. Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle. *Theriogenology* 61:103-115.
  24. Verberckmoes, S., Van Soom, A., Dewulf, J., Thys, M. and de Kruif, A. 2005. Low dose insemination in cattle with the Ghent device. *Theriogenology* 64:1716-1728.
  25. Vittone, J. S., Aller, J. F., Otero, G., Scena, C., Alberio, R. H. and Cano, A. 2011. Destete precoz y desempeño reproductivo en vacas tratadas con progesterona intravaginal. *Arch. Zootec.* 60:1065-1076.
  26. Williams, B. L., Senger, P. L. and Oberg, J. L. 1987. Influence of cornual insemination on endometrial damage and microbial flora in the bovine uterus. *J. Anim. Sci.* 65:212-216.