

## CAPÍTULO XII

### TRANSPLANTE DE EMBRIONES EN BOVINOS MESTIZOS DE DOBLE PROPOSITO

- I INTRODUCCIÓN
- II CRITERIOS DE SELECCIÓN DE HEMBRAS  
DONADORAS Y RECEPTORAS DE EMBRIONES.
- III CONTROL DEL ESTRO Y OVULACION DE  
HEMBRAS DONADORAS Y RECEPTORAS  
MESTIZAS.
- IV TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO DE  
DONADORAS MESTIZAS
- V RECOLECCIÓN NO QUIRÚRGICA DE EMBRIONES
- VI PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN VACAS  
MESTIZAS
- VII TRANSPLANTE NO QUIRÚRGICO DE EMBRIONES
- VIII LITERATURA CITADA

Rumualdo González F.

## I. INTRODUCCIÓN

La ganadería lechera del país es predominantemente mestiza, la cual ha sido producto de un cruzamiento indiscriminado entre las razas criollas, cebuínas y lecheras especializadas. Es de destacar que un grupo minoritario de 5 a 10 % de las vacas que conforman esta ganadería podrían ser potencialmente hembras donadoras de embriones debido a sus características superiores en cuanto a producción de leche, fertilidad y longevidad. Acelerar la descendencia de estos animales con el uso de toros probados de alto valor genético fomentaría el desarrollo de grupos de bovinos élite los cuales servirían de base para la formación de un modelo de ganadería tropical. Por otro lado, dicho programa podría satisfacer la demanda de toretes mestizos superiores destinados a los centros de Inseminación Artificial (I.A.) y a un futuro plan de mejoramiento genético nacional. Estos argumentos justifican plenamente la difusión de la técnica de T.E. en nuestro medio.

Comúnmente hembras mestizas son utilizadas como donadoras o receptoras de embriones con fines experimentales y comerciales respectivamente (1). Hasta el presente no se conoce información sobre la importancia o beneficio de emplear donadoras mestizas en programas de mejoramiento genético en ganaderías lecheras en el trópico.

En nuestro país, los primeros ensayos sobre T.E. en ganado mestizo lechero fueron realizados en la Hacienda "El Capitán", Máchiques, Edo. Zulia (2).

El propósito de este trabajo es de dar a conocer los resultados de diferentes experiencias realizadas sobre T.E. en bovinos mestizos de doble propósito en nuestro medio.

## II. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE HEMBRAS MESTIZAS DONADAS Y RECEPTORAS DE EMBRIONES

### Selección de Hembras Donadoras

Fueron previamente seleccionadas vacas con lactancias superiores a los 3.500 kg/244 días, un intervalo entre partos de 12-13 meses, 1.5-1.8 servicios promedios por preñez, un descanso mínimo de 60 días post-parto (P.P.), buena condición corporal, ausencia de alteraciones reproductivas y estar libres de enfermedades comunes como: brucelosis, leptospirosis, vibriosis,

trichomoniasis, tuberculosis y otras. Igualmente que el animal presentara una ubre sana y sin historial de mastitis crónica.

### Selección de Hembras Receptoras

El tipo de animal utilizado como receptora fue principalmente la novilla mestiza cebú debido a su menor costo y mayor disponibilidad de los rebaños. Se seleccionaron novillas vacías con un peso mínimo de 350 Kg., sanitariamente sanas y con ciclos estruales regulares.

### Evaluación del canal cervical como criterio de selección

Es bien conocido que el cérvix constituye el trayecto anatómico más dificultoso para el emplazamiento del catéter en la cavidad uterina durante el proceso de lavado de donadoras o el trasplante propiamente dicho de los embriones por vía no-quirúrgica.

Según un estudio previo, en 102 y 82 de las hembras donadoras y receptoras respectivamente no fue posible realizar el pase de catéter a través del cérvix (3). Tomando en cuenta estas observaciones un estudio fue llevado a cabo para evaluar el grado de permeabilidad del canal cervical en hembras que previamente habían sido seleccionadas como posibles donadoras o receptoras de embriones.

De un total de 78 donadoras multíparas y 176 receptoras (120 vacas primíparas y 56 novillas vírgenes) presentaron 141 (54.0 %), 63 (24.2 %) y 50 (21.5%), facilidad (grado 1) hasta 1 minuto de manipulación, dificultad (grado 2) más de 1 minuto de manipulación e imposibilidad (grado 3) respectivamente para atravesar el canal del cervix con una pipeta plástica desechable de I.A. Un mayor porcentaje de grado 3 de 25.6 % y 27.5% fue observado en las vacas primíparas y novillas respecto a las vacas multíparas de 12.8 % ( $P < 0.05$ ). Según estos valores es condición importante como criterio de selección, el examen cuidadoso del cervix conjuntamente con la prueba de permeabilidad en este tipo de ganado mestizo durante el proceso de clasificación como futuras hembras donadoras y receptoras de embriones (4).

### III. CONTROL DEL ESTRO Y OVULACION EN HEMBRAS DONADORAS Y RECEPTORAS MESTIZAS

Los programas de superovulación y trasplante directo de los embriones, requieren como condición importante que tanto las vacas donadoras y receptoras, presenten celo en un mismo período, o con una diferencia no mayor de 24 horas entre ambos grupos de animales al momento de realizar una operación de trasplante de embriones en fresco. De igual manera, cuando un grupo de donadoras se someten a los programas simultáneos de producción de embriones, ellas deben encontrarse fisiológicamente en un rango de 9-14 días del ciclo estrual al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio.

Para garantizar el mayor porcentaje tanto de donadoras como de receptoras bajo la misma situación reproductiva se recomienda la práctica de sincronización del estro.

#### Sincronización del estro de las donadoras

Para la sincronización de las vacas donadoras fue utilizado el SINCROMATE B (SMB, Lab. Intervet, Francia ). Dicho producto consta de un implante de silicona impregnado de 3 mg. de Norgestomet, el cual es aplicado subcutáneamente (ST). Al momento de colocar el implante fueron aplicados 2 ml. de una solución compuesta por 3 mg. de Norgestomet y 5 mg. de Valerato de Estradiol, vía intramuscular(Im). El implante fue retirado el día noveno, habiéndose inyectado 24 horas antes 25 mg. de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (Lutalyse, Lab.Upjhon, Venezuela) (Im). Mayoritariamente los animales exhiben el celo entre las 24 y 48 horas post-tratamiento.

De un total de 310 donadoras que fueron sincronizadas con la combinación SMB-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , 288 (92.9 %) exhibieron celo y 263 (75,1 %) ovularon, lo cual fue normalmente constatado por la presencia de un cuerpo lúteo maduro 9-12 días post-tratamiento. Estos valores se corresponden con los reportados por Donaldson (5), de 92% y 68 % de donadoras que mostraron celo y ovularon respectivamente después de la sincronización del estro. Debido a los satisfactorios resultados obtenidos con este modelo de tratamiento (SMB-PGF 2 $\alpha$ ), el mismo fue estandarizado como método de sincronización del estro de donadoras mestizas en los programas comerciales de T.E. en nuestra región.

### Sincronización del estro en las receptoras

Las novillas receptoras fueron sincronizados con PGF2 $\alpha$  o empleando el tratamiento SMB. Un promedio de 8-10 receptoras fueron sincronizadas por cada donadora sometida a tratamiento superovulatorio.

#### Empleo de PGF2 $\alpha$ para la sincronización del estro.

Un total de 349 novillas mestizas con predominancia racial cebuina, fueron asignadas a dos grupos de 192 (Grupo A) y 156 (Grupo B) respectivamente para la sincronización del estro mediante métodos diferentes de aplicación de la PGF2 $\alpha$ . El grupo A, recibió una dosis única de 30 mg. i.m. en presencia de cuerpo lúteo. El grupo B, fue tratado mediante régimen convencional de doble dosis de 30 mg. cada una con intervalo de 11 días. El estro fue detectado mediante observación visual dos veces diarias con una duración mínima de una hora. Los datos de exhibición de estro entre 48 y 72 horas después de aplicada la PGF2 $\alpha$  muestran que una mayor incidencia ( $P < 0.05$ ) de animales en estro se logró cuando la PGF2 $\alpha$  fue aplicada en presencia de cuerpo lúteo en comparación con el régimen de doble inyección (6).

#### Sincronización del estro receptoras con SMB

Un total de 200 hembras receptoras (161 vacas y 39 novillas), fueron sincronizadas con SMB, de las cuales exhibieron estro, 112 (69.5%) y 39 (100 %) vacas y novillas respectivamente 24-48 horas post-tratamiento ( $P < 0.05$ ).

El tratamiento SMB, resultó más efectivo para la inducción del estro en novillas vs. vacas. Igualmente fueron observadas manifestaciones de estro más intensas y prolongadas en las novillas respecto a las vacas (7).

## IV TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO DE DONADORAS MESTIZAS

Para la superovulación de las donadoras fue empleada la hormona foliculo estimulante de origen porcino (FSH-P, Lab. Shering, USA). La dosis

empleada fue de 28-36 mg. de la hormona administrada bajo el régimen decreciente de 5.5; 4.5; 3.5; 2.5, y 2 mg. i.m. cada 12 horas por un lapso de 4 1/2 -5 días. El cuarto día del tratamiento se aplicaron 30 mg. de PGF<sub>2a</sub> i.m. con el objeto de inducir el celo.

Un total de 206 vacas metizas múltiparas de 5-14 años de edad fueron superovuladas durante la fase luteal del ciclo estrual (8-14 días post-celo), de las cuales 196 (95.1 %) exhibieron celo y fueron inseminadas a las 12 y 24 horas después de iniciado el celo. Es importante señalar que 82.1 % de las hembras iniciaron el celo entre 3 am y 2 pm. del quinto día del tratamiento superovulatorio. En este tipo de ganado un régimen de 4 ó 4 1/2 día de tratamiento con FSH-P, resultó efectivo para la superovulación. Es oportuno informar que una dosis de 40 mg. de FSH-P generalmente provoca una fuerte respuesta ovulatoria con detrimento en la tasa de producción de embriones en este tipo de ganado y más específicamente en las hembras con predominancia cebú.

## V. RECOLECCIÓN NO QUIRÚRGICA DE EMBRIONES

Debido a las dificultades que presenta el canal del cérvix de estos bovinos mestizos, los modelos convencionales de sondas comerciales que comúnmente se utilizan para realizar el lavado en vacas lecheras de raza puras son poco recomendables. Por lo que fue necesario confeccionar un modelo de sonda de recolección, que resultara segura, económica, de sencilla fabricación y que permitiera una fácil manipulación durante el paso del cérvix (8).

### Procedimiento para la recolección

Para la recolección, no quirúrgica de los embriones fue empleada la técnica originalmente descrita por Sugie (9) y perfeccionada por Drost (10). Después de 6 1/2- 8 días de la I.A., los animales fueron inmovilizados en un brete mecánico, seguido del examen de los ovarios para evaluar la respuesta superovulatoria mediante conteo del número de cuerpos lúteos (CL) por vía rectal.

Aquellas hembras con 3 o menos CL fueron descartadas. Después de la limpieza y desinfección de los genitales externos y la posterior aplicación de 5 ml. de Novocaina al 2% como anestesia epidural, se procedió a la intro-

ducción de la sonda por vía vaginal. Una vez atravesado el cérvix, el extremo anterior de la sonda fue emplazada en el cuerpo en un determinado cuerno del utero sólo, seguido de la insuflación del balón con 10-15 ml. de aire. Este ganado mestizo se caracteriza por tener cuernos uterinos de menor diámetro que las vacas lecheras de talla grande como Holstein ó Pardo Suizo, las cuales requieren de un volumen mayor de 25-30 ml. de distensión de balón (11).

El líquido utilizado para realizar el lavado uterino fue medio Dulbecco (fosfato-buffer-salino) suplementado (11), con glucosa y 2% de suero inactivado de novillo (SIN). Un volumen de 800-1000 ml. de la solución fue utilizado por animal. El líquido fue introducido y drenado por gravedad a través de un circuito construido de mangueras de Tygon 1/16 de diámetro interno.

### Procedimiento de Concentración de los Embriones

Para simplificar el Procedimiento de identificación de los embriones en el medio producto del lavado uterino fue empleado el método de sedimentación en ampollas.

El líquido proveniente del lavado uterino de cada donadora fue coleccionado en ampollas de vidrio de 200 ml., estériles, siliconadas y con una válvula ventral de drenaje. Las ampollas fueron dejadas en reposo durante 30-40 min antes de tomar una muestra de 50 ml. del líquido sedimentado en una placa de petri desechable 100 x 100 mm. Después de 5 min las placas previamente identificadas fueron colocadas en la lupa estereoscópica 40 x para la identificación de los embriones.

## VI PRODUCCION DE EMBRIONES EN VACAS MESTIZAS.

### Indice de Recolección de Donadoras.

De 196 donadoras superovuladas, solamente 158 (76.6 %) fueron lavadas, el resto de los animales se descartaron por baja respuesta ovárica, dificultades durante el proceso de recolección o metritis. Según Donalson (12), sólo un 68 % de las hembras superovuladas fueron consideradas como donadoras realmente productivas. Nuestras cifras resultaron ligeramente superiores al 76% en vacas mestizas.

## Identificación y Clasificación de los Embriones Recolectados

Después de 40 min de reposo del líquido recolectado, producto del lavado uterino, se procedió a tomar un volumen de 20 ml. del sedimento de cada ampolla o del filtrado de la recolección. La muestra fue depositada en una placa de petri cuadrada (100 x 100 mm.) desechable. Para la busqueda de los huevos, se utilizó una lupa estereoscópica de 40 X . Los huevos identificados fueron aspirados en un tubo capilar no heparinizado y posteriormente depositados en una pequeña placa de petri redonda ( 35 x 10 mm.) conteniendo 2 ml. de solución de Dulbecco suplemento con 10 % de SIN. Después de tres lavados consecutivos con la misma solución, los huevos fueron clasificados según su morfología, en embriones transferibles (E.T), embriones degenerados (E.D) y ovulos no fecundado (O.N.F.).

De 158 donadoras lavadas fueron recolectadas 1.387 huevos, de los cuales 996 (71.8 %), 268 (19.3 %) y 130 (9.3 %) fueron E.T, E.D y O.N.F. respectivamente para un rendimiento individual de 8.7 huevos y 6 E.T. por donadora. Este último valor fue superior al reportado por Donaldson, (5) de 4.0% E.T. en 1263 donadores superovuladas de raza Holstein.

## VII TRANSPLANTE NO QUIRÚRGICO DE EMBRIONES

Los embriones recolectados de calidad transferibles fueron trasplantados directamente en fresco o congelados para su almacenamiento y posterior colocación.

Para el TNQ los embriones fueron aspirados dentro de una manipajuela según técnica descrita por Massip y col. (13). Para la realización de transplante propiamente dicho se empleó la pistoleta miniaturizada de transplante modelo Cassou. Las receptoras 6 1/2-8 días después del estro sincronizado con SMB o PGF2 $\alpha$  recibieron un embrión comercial en el cuerno ipsilateral con respecto al CL. Las hembras fueron inmovilizadas en un brete mecánico, seguido del lavado de los genitales externos y aplicación de 5 ml de Novocaina al 5 % como anestesia epidural. Para reducir los riesgos de contaminación, la pistoleta fue protegida con una camisa plástica hasta la entrada del cervix.

### Tasa de Preñez Post-TNQ en novillas mestizas sincronizadas con PGF2 $\alpha$

De 82 novillas sincronizadas con una s3la dosis de PGF2 $\alpha$  en presencia de CL y 45 novillas sincronizadas con doble dosis de 30 mg. con un intervalo de 11 d3as resultaron preñadas 38 (46.3 %) y 24 (53 %) de cada grupo respectivamente ( $P > 0.05$  %).

### Tasa de Preñez Post-TNQ en Receptoras Mestizas Sincronizado con SMB

De 100 vacas y 39 novillas receptoras cuyo celo fue sincronizados con SMB y que recibieron un embri3n por TNQ se preñaron 39 (39.0 %) y 7 (17.8 %) respectivamente. El SMB result3 más efectivo sobre la tasa de preñez en vacas respecto a las novillas ( $P < 0.05$ ). Es probable que el implante de SMB, provoque fallas en el desarrollo y actividad del CL ó alteraci3n en la segmentaci3n de los embriones Pos-TNQ.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el implante de SMB, el mismo no ser3a recomendable para la sincronizaci3n del celo en novillas mestizas cebú, debido al bajo porcentaje (17.8 %) de preñez logrado Post-TNQ (7).

## VIII . LITERATURA CITADA

1. Kitto, G. P. Tips and considerations in embryo transfer. *Theriogenology*. 21:4 1985.
2. Gonz3lez, R. E. Soto y R. Bohorquez. Ensayos preliminares sobre superovulaci3n y recolecci3n de embriones en vacas mestizas. Hda. "El Capit3n" Machiques. Sem. Facultad de Veterinaria, L.U.Z. 1979.
3. Brand, A., M. H. Aarts, D. Zaayer and W. D. Oxender. Recovery and transfer of embryos by non-surgical procedures in lactating dairy cattle. In *Control of Reproduction*. pp. 281-291. Ed. J. M. Srenau Martorius Nijhoff. The Hague, 1978.
4. Gonz3lez, R. E. Soto, R. Boh3quez. Patency of cervical canal in Crossbred female Zebu x Brown Swiss selected for non-surgical recovery or transfer of embryos. *Theriogenology* 19:5 1983a.
5. Donaldson, LL. E. Embryo production in superovulated cows: Transferable embryos correlated with total embryos. *Theriogenology*, 2:14, 517-525, 1984.
6. Gonz3lez, R. Comparaci3n de dos m3todos de sincronizaci3n del estro con Prostaglandina F2 $\alpha$  en receptoras mestizas cebú. Mem. I Jornadas de Investigaci3n Facultad de Veterinaria, L.U.Z.
7. Gonz3lez, R. E. Soto y R. Bohorquez. Pregnancy rate in crossbred recipients (Zebu x Dairy Breeds) synchronized with Norgestomet (Abst.) *Theriogenology* 21:1. 1984.
8. Gonz3lez, R. Avances sobre el trasplante de embriones en Ganado Mestizo. I JONIRA. 1985. Maracaibo-Venezuela.

9. Sugie, T.T. Soma., S. Fukumitsu and K. Otsuki, Studies on the ovum transfer in cattle with special reference to coleccion of ova by means of nonsurgical techniques. Bull. Nat.Inst. Anim. Ind. 25:27. 1972.
10. Drost, M., A. Brand and M.H. Aarts. A device for non-surgical recovery of the bovine embryos. Theriogenology. 6:5 1976.
11. Wittinghan, D. G., S. P. Leibo and P. Mazure. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$ . Science, N. Y.411-414, 1972.
12. Donaldson, LL. E. Embryos, production in superovulated cows: transferable embryos correlated with total embryos: Theriogenology, 21:4, 517-525, 1984.
13. Massip, A., P. Vanderzwalen, F. Ectors, R. D. De Coster, G. Ieterm and C.Hanzen. Deep freezing of cattle embryos in glass ampule or french straws. Theriogenology 12: 79-84