

COMUNICACIÓN

**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA NO QUIRÚRGICA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS EN UN ESTABLO DE LA CUENCA LECHERA DE LIMA**

**APPLICATION OF THE NON-SURGICAL BOVINE EMBRYO TRANSFER TECHNIQUE IN A DAIRY FARM IN THE LIMA MILKSHED**

**Jonathan Medrano R.<sup>1</sup>, Shirley Evangelista V.<sup>1</sup>, Rocío Sandoval M.<sup>1</sup>, Luis Ruiz G.<sup>1</sup>, Alfredo Delgado C.<sup>2</sup>, Alexei Santiani A.<sup>1,3</sup>**

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta superovulatoria y la tasa de concepción al aplicar la técnica no quirúrgica de transferencia de embriones en vacas lecheras de un establo comercial de la cuenca de Lima. Se utilizaron ocho vacas donadoras, distribuidas en dos años de trabajo. Estas fueron sincronizadas con estrógenos, progestágenos y agentes luteolíticos, superovuladas con 400 mg de FSH e inseminadas con dos dosis de semen congelado. Se utilizaron 28 receptoras, también distribuidas en dos años. En el primer año se sincronizaron con el protocolo Pre-synch y en el segundo año con el protocolo CIDR-synch. Se hizo coincidir el día esperado del celo de las donadoras y receptoras. Los embriones fueron recolectados en el día siete del servicio, se clasificaron y se transfirieron de inmediato a las receptoras. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía transrectal al día 28 postransferencia. Se obtuvieron 23 embriones, siendo la tasa de recuperación de 36.5% con gran variación entre años. Se transfirieron 17 embriones obteniéndose una tasa de concepción de 40.0%, con gran variación entre años (22.2 y 66.7%). La variada respuesta individual de las donadoras afectó la tasa de recuperación de embriones y el protocolo de sincronización afectó la tasa de concepción.

**Palabras clave:** transferencia de embriones, donadoras, receptoras, sincronización, superovulación

<sup>1</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, <sup>2</sup> Clínica de Animales Mayores, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

<sup>3</sup> E-mail: asantiani@hotmail.com

Recibido: 29 de mayo de 2013

Aceptado para publicación: 20 de octubre de 2013

## ABSTRACT

The study aimed to evaluate the superovulatory response and conception rate by applying the technique of non-surgical embryo transfer in dairy cows of a commercial farm in the Lima milkshed. Eight donor cows were used and distributed in two working years. Donors were synchronized with estrogens, progestagens and luteolytic agents, superovulated with 400 mg of FSH, and inseminated with two doses of frozen semen. The recipient animals (n=28) were also distributed in two years. The Pre-synch protocol was used for estrus synchronization in the first year and the CIDR-synch protocol in the second year. The expected day of heat presentation coincided for both donors and recipients. The recovery of embryos was done seven days post service where embryos were classified and immediately transferred. Pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography was done at day 28 post transfer. A total of 23 embryos were obtained. The embryo recovery rate was 36.5% with high variation between years. Seventeen embryos were transferred and the conception rate was 40% with high variation between years (22.2 and 66.7%). The varied individual response of the donors affected the embryo recovery rate and the synchronization protocol affected conception rate.

**Key words:** embryo transfer, donor, recipient, synchronization, superovulation

## INTRODUCCIÓN

La técnica de transferencia de embriones (TE) permite seleccionar animales de alta producción y adecuada adaptabilidad ambiental para mejorar la calidad genética e incrementar el número de crías en el hato (Elsden y Seidel, 1986).

La tasa de éxito en términos de concepción por transferencia de embriones se encuentra cercano al 60%, incluso con la transferencia de embriones congelados (Cutini *et al.*, 1999). Otros reportes indican promedios que varían entre un 40 a 70% dependiendo del uso de embriones frescos y congelados (Lohouis *et al.*, 1993).

En México, Arriaga (2010) indica tasas de concepción entre 35 a 65%, dependiendo de la calidad de embriones transferidos y de la habilidad del operador para realizar la TE. Las tasas de concepción obtenidas en la provincia de Santander, Colombia, entre 1999 y 2001, fueron de 12 a 40% (Ariza *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso de esta técnica en el país es aún escaso y los resultados obtenidos son

en su mayoría de acceso limitado. Rengifo *et al.* (2011) evaluaron dos protocolos de superovulación con distintas dosis de eCG, recuperando en promedio 4.9 y 5.3 embriones transferibles por vaca en cada programa, pero no se reportan resultados de la tasa de concepción ni de la natalidad. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la respuesta superovulatoria y la tasa de concepción al aplicar la técnica no quirúrgica de transferencia de embriones en vacas lecheras de un establo comercial de la cuenca de Lima.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar y Animales de Estudio

El estudio se realizó en un establo lechero ubicado en la provincia de Huaura, Lima. Se utilizaron ocho vacas Holstein como donadoras, distribuidas en dos grupos de cuatro animales. El primer grupo se trabajó entre septiembre y noviembre de 2008, y el segundo grupo entre octubre y noviembre de 2009. Las vacas tenían de 90 a 140 días de

lactación y no presentaban problemas metabólicos ni sanitarios posparto. Además, como receptoras se utilizaron 6 vacas y 10 vaquillas en el primer grupo y 12 vaquillas en el segundo grupo.

### Procedimiento Metodológico

#### *Protocolo de superovulación para vacas donadoras*

El protocolo consideró el día 0 como el día programado para la presentación de celo (Bó *et al.*, 1995). En el día -10 se aplicó un dispositivo intravaginal liberador de progestágenos (CIDR Eazi – Breed, AGTECH) a las vacas donadoras, a la vez que recibieron por única vez 0.6 ml (1.8 mg) de benzoato de estradiol (Estrovet, Montana, Perú) vía i.m. Los días -4, -3, -2 y -1 se aplicó FSH, 20 ml de Folltropin-V (Bioniche, EEUU) por vaca, equivalente a 400 mg de NIH-FSH), distribuido en dosis decrecientes 2 veces/día como tratamiento superovulatorio (60, 60, 50, 50, 50, 50, 40 y 40 mg de NIH-FSH por vez, lo cual equivale a 3.0, 3.0, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5, 2.0 y 2.0 ml de Folltropin-V) vía i.m. El día -2 se aplicó 0.5 mg de cloprostenol vía i.m., análogo sintético de prostaglandina (PGF<sub>2a</sub>, 2 ml de Lutaprost 250, HOFARM; Perú) por la mañana y se retiraron los dispositivos CIDR por la tarde (Kanawaga *et al.*, 1995).

La primera inseminación artificial (IA) se realizó a las 60 horas de la aplicación de PGF<sub>2a</sub> y la segunda IA se hizo 12 horas después (Kanawaga *et al.*, 1995). Se utilizó semen congelado de origen americano de dos toros distintos en cada año de estudio. La recolección de los embriones se hizo a los siete días de la IA (Elsden *et al.*, 1976). Se administró 0.5 mg de cloprostenol vía i.m. al término de la recolección de embriones.

#### *Protocolo de sincronización de celo de vacas receptoras*

En el primer grupo de receptoras se utilizó el programa de presincronización Presynch (Moreira *et al.*, 2000). Las vacas re-

cibieron una primera dosis de 0.5 mg de cloprostenol vía i.m. y 14 días después una segunda dosis similar. Catorce días después se empleó el protocolo de sincronización Ovsynch (Taponen, 2009), considerándose el día 0 como el día programado para la observación del celo. Los días -10 y -1 se inocularon 0.01 mg de acetato de buserelina, análogo de GnRH (2.5 ml de Conceptal, Intervet) vía i.m. El día -3 se aplicó 0.5 mg de cloprostenol vía i.m. y la conducta de celo se observó en el día 0.

El segundo grupo de receptoras fue sincronizado con el protocolo CIDR-Synch (Balla *et al.*, 2006) utilizando CIDR y 0.01 mg de acetato de buserelina vía i.m. el día -10, repitiéndose la misma dosis de buserelina el día 0. El día -2 se aplicó 0.5 mg de cloprostenol vía i.m. y se retiraron los dispositivos CIDR.

Los protocolos se aplicaron de forma tal que coincidieran en el día 0 tanto las vacas donantes como las receptoras, de modo que las receptoras tuvieran un cuerpo lúteo de siete días en el momento del lavado de las donadoras.

#### *Protocolo de lavado uterino y recolección de embriones con circuito cerrado y flujo discontinuo*

La donadora fue localizada en un brete, desinfectándose la zona perineal y vulvar. Se aplicó anestesia epidural baja con 40 a 80 mg de clorhidrato de lidocaína (2 a 4 ml de lidocaína 2%, Equi Systems), dependiendo de los signos de relajación.

Se utilizó un catéter Foley de 2 vías de 18FR con balón de 30 cc (AGTECH), fijado a un estilete de acero de 25" de largo (AGTECH) para facilitar el paso del catéter a través del tracto reproductor. El catéter se ubicó 3 a 5 cm por delante de la bifurcación externa de los cuernos (Kanawaga *et al.*, 1995). Luego se realizó la recuperación de embriones empleando el método no quirúrgico en base a un circuito cerrado con flujo discontinuo (Elsden *et al.*, 1976). Este pro-

ceso se repitió 8 a 10 veces hasta completar el ingreso de 500 ml del medio. Una vez terminado el lavado del primer cuerno, se repitió la operación en el otro, utilizando un nuevo catéter. La temperatura del medio de lavado se mantuvo entre 37 a 39 °C con ayuda de un baño maría.

Se tuvo un operador para cada año, los cuales siguieron el mismo protocolo de lavado uterino y recolección de embriones. Ambos operadores tenían el mismo grado de instrucción y capacitación en la TE pero diferente grado de experiencia. Cada operador trabajó con dos vacas donantes.

#### *Protocolo de búsqueda y clasificación de embriones*

La recuperación y búsqueda de embriones en el medio de lavado se hizo según lo descrito por Kanawaga *et al.* (1995). El medio de lavado se redujo mediante el método de filtración, utilizando filtros de colección de embriones EmCom (Agtech, EEUU) de 150 ml de capacidad y 70 µm de diámetro de poro. Se emplearon pequeñas placas Petri conteniendo 3 a 5 ml de medio de conservación (Agtech, EEUU), que contenía D-PBS con suero de ternero y se mantuvieron a 37 °C para el aislamiento de los embriones.

La evaluación y clasificación morfológica de los embriones se hizo siguiendo las recomendaciones de la International Embryo Transfer Society – IETS (Stringfellow y Seidel, 1990).

#### *Protocolo de transferencia de embriones con técnica no quirúrgica*

La receptora fue localizada en un brote, desinfectándose la zona perineal y vulvar. Los embriones fueron cargados en la pajilla según el procedimiento descrito por Palma (2008). La pajilla se colocó dentro de la pistola de cámara profunda para T.E. y esta se puso dentro de la funda para pistola de embriones (Agtech, EEUU). La pistola se intro-

dujo a través del canal cervical depositando el embrión a la mitad del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo. Dos receptoras del primer grupo recibieron dos embriones, siendo el segundo embrión depositado en el cuerno uterino contralateral al cuerpo lúteo encontrado.

#### *Diagnóstico de gestación*

Se determinó la tasa de no retorno en el día 21 poscelo. La preñez fue confirmada mediante ecografía rectal a los 28 días posteriores a la transferencia (35 días de gestación), utilizando un ecógrafo Chison equipado con un transductor lineal de 7.5 MHz de frecuencia.

#### **Análisis de Datos**

Se analizó a) el número de cuerpos lúteos por donadora, determinado mediante palpación rectal el día de la transferencia, b) el número de embriones recuperados por vaca donadora, c) el porcentaje de recuperación de embriones, el cual se define como la proporción porcentual de embriones recuperados en base al número de cuerpos lúteos por vaca donadora, d) la tasa de no retorno, definida como la proporción porcentual de receptoras que no presentan signos de celo al día 14 posterior a la TE en base al total de receptoras, y e) la tasa de concepción, definida como la proporción porcentual de vaquillas preñadas del total de vaquillas que recibieron embriones.

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestra la respuesta reproductiva al protocolo de superovulación por año de estudio. El 75% (6/8) de las donadoras presentaron celo manifiesto el día 0. El segundo año se observó mayor cantidad de cuerpos lúteos; sin embargo, en el primer año se recuperó mayor cantidad de embriones (53.8 y 24.3% en el primer y segundo año, respectivamente), dando una tasa total de recuperación de embriones de 36.5%.

Cuadro 1. Respuesta reproductiva al protocolo de superovulación por año de estudio

	2008	2009	Total
Donantes (n)	4	4	8
Presentación de celo (%)	75%	75%	75%
Total de cuerpos lúteos (día 7) (n)	26	37	63
Cuerpos lúteos (día 7) (promedio $\pm$ d.e.)	6.5 $\pm$ 0.6	9.3 $\pm$ 3.3	7.9 $\pm$ 2.6
Total de embriones recuperados (n)	14	9	23
Embriones recuperados por vaca (promedio $\pm$ d.e.)	3.5 $\pm$ 3.5	2.3 $\pm$ 3.3	2.8 $\pm$ 3.2
Recuperación de embriones (%)	53.8%	24.3%	36.5%

Cuadro 2. Respuesta reproductiva al protocolo de sincronización de celo por año de estudio

	2008	2009	Total
Número receptoras sincronizadas	16	12	28
Tasa presentación celo (día 0)	7/16 (43.8%)	5/12 (41.7%)	12/28 (42.9%)
Número embriones transferidos	11	6	17
Número receptoras transferidas	9	6	15
Tasa no retorno a celo (día 21)	5/9 (55.6%)	5/6 (83.3%)	10/15 (66.7%)
Tasa de concepción (día 35)	2/9 (22.2%)	4/6 (66.7%)	6/15 (40.0%)

El número de embriones recuperados por vaca fue muy variable. Se recuperó 20 de los 26 embriones de tres donadoras, tres embriones de dos donadoras y ningún embrión de tres vacas.

El Cuadro 2 muestra la respuesta fisiológica a la sincronización de celos de las receptoras. La tasa de celo manifiesto (42.9%, 12/28) fue similar en ambos años. Las tasas de no retorno y de concepción fueron mayores en el segundo año.

## DISCUSIÓN

La detección del celo en 6 de las 8 donadoras puede ser considerado como una baja tasa de detección de signos de celo. Cox *et al.* (1999) sincronizaron vacas Holstein con GnRH y PGF<sub>2α</sub> consiguiendo una tasa de presentación de celo del 85.5%. Es posible que los dos animales no detectados en celo hayan tenido niveles altos de progesterona al momento del retiro del CIDR y administración de PGF<sub>2α</sub>, lo que habría afectado el desarrollo folicular (Jaiswal *et al.*, 2004). Además, hay que considerar las posibles fallas humanas en la detección del celo.

El promedio de cuerpo lúteo obtenidos (7.9 por vaca) fue menor al estudio de Willmott *et al.* (1990), quienes trabajaron con 81 vacas de carne empleando 400 mg de NIH-FSH-P1. Al respecto, Becaluba (2007) sostiene que las vacas de carne producen muy buena respuesta al programa de superovulación con dosis menores de NIH-FSH-P1 de Folltropin-V® que la utilizada en el presente estudio (133 a 260 mg por vaca permiten una buena respuesta). Adicionalmente, la gran variabilidad individual en la respuesta a los programas de superovulación es un factor determinante, como ha ocurrido en el presente estudio.

Este factor de variabilidad individual se ve reflejado también en la cantidad de embriones recuperados, donde se logró recuperar 20 embriones de 7 donantes (6-7 por vaca) y ningún embrión de otras tres donadoras. Por otro lado, Díaz *et al.* (2012) utilizando Folltropin-V® reportan un promedio de 10.5 embriones recolectados por animal. Cabe añadir que la pérdida de embriones durante el lavado sería un factor importante al momento de evaluar los resultados (Kanawaga *et al.*, 1995).

Las tres vacas que produjeron el 87% de los embriones equivalen al 37.5% del total de donadoras. Al respecto, Looney (1986) señala que el 30% de animales superovulados

producen el 70% de los embriones recuperados. Asimismo, Armstrong (1993) indica que el 25-30% de las vacas tratadas no producen embriones de buena calidad. Por tanto, los resultados encontrados siguen la tendencia de la gran variabilidad en la respuesta a la superovulación y en la producción de embriones reportada en diversos estudios, la cual está ligada a factores tales como aquellos relacionados con el embrión, el protocolo de superovulación y la fisiología de las donadoras (Stringfellow y Seidel, 1990).

Los resultados de sincronización de celos en las receptoras fue menor de lo esperado, indistintamente del protocolo utilizado (Prestynch o CIDR-synch). Silcox *et al.* (1995) obtuvieron 87.5% de presentación de celo con el protocolo Ovsynch en vacas en lactancia, mientras que Martínez-González *et al.* (2007) sincronizaron 50 hembras Holstein con un protocolo similar al utilizado en el presente estudio, pero incluyendo el uso de eCG (NOVORMON 5000 Syntex®), logrando una tasa del 76%.

Tríbulo *et al.* (2000) trabajaron con vacas de carne, sincronizadas con CIDR-B® y benzoato de estradiol y efectuaron la TE sin detección de celo, obteniendo una tasa de concepción del 62.7%. Este porcentaje es similar al obtenido en el presente estudio con el programa CIDR-synch en 2009 (4/6, 66.7%). En el mismo sentido, Díaz *et al.* (2012) consigue una tasa de concepción del 40.9% en vacas de leche.

Se podría concluir que la variada respuesta individual de las donadoras afectó la tasa de recuperación de embriones y el tipo de protocolo de sincronización afectó la tasa de concepción.

## LITERATURA CITADA

1. Ariza LE, Camacho W, Serrano-Novoa CA. 2006. Evaluación retrospectiva de la tasa de preñez obtenida por transferencia de embriones en diferen-

- tes cruces bovinos en el municipio de Puerto Araujo, Santander, Colombia. REDVET 7(4): 1-7.
2. **Armstrong DT. 1993.** Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology 39: 7-24.
  3. **Arriaga J. 2010.** Transferencia de embriones en ovinos. Revisión. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Michoacán: Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 55 p.
  4. **Balla E, Filippi L, Maraña-Peña D, Pincinato D, Peres LC, Cutaia L, Veneranda G, Martínez MF, Bó GA. 2006.** Efectos de diferentes protocolos de sincronización de la ovulación con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el desarrollo folicular y las tasas de preñez en vacas lecheras en lactancia. En: Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos. Córdoba: IRAC.
  5. **Becaluba F. 2007.** Factores que afectan la superovulación en bovino. [Internet], [11 marzo 2013] Disponible en: <http://www.engormix.com/MAGanaderia-carne/genetica/articulos/factores-afectan-superovulacion-bovino-t1684/p0.htm>
  6. **Bó GA, Adams GP, Caccia M, Martínez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995.** Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. Animal Reprod Sci 39: 193-204.
  7. **Cox JF, Contreras V, Letelier N, Sarabia F, Santa María A, Lobos A, Recabarren S. 1999.** Sincronización de estros con GnRH y prostaglandina PGF<sub>2α</sub> en vacas Holstein Friesian en confinamiento. Arch Med Vet 31(1): 19-25.
  8. **Cutini A, Teruel M, Cabodevila J. 1999.** Criopreservación de embriones de especies de interés pecuario. Rev Arg Prod Anim 19: 447-469.
  9. **Díaz R, Rengifo O, Almeyda J. 2012.** Técnica de multiovulación y transferencia de embriones de ganado bovino en condiciones de trópico del Perú. AgroInnova 13: 18-23.
  10. **Elsden R, Hasler J, Seidel G. 1976.** Non-surgical recovery of bovine eggs. Theriogenology 6: 523-532.
  11. **Elsden R, Seidel J. 1986.** Procedimientos para recolección, división, congelación y transferencia de embriones bovinos. EEUU: Colorado State University. 45 p.
  12. **Jaiswal RS, Singh J, Adams GP. 2004.** Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. Biol Reprod 71: 1244-1251.
  13. **Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. 1995.** Manual of bovine embryo transfer. Japan: Japan Livestock Technology Association. 432 p.
  14. **Lohouis MM, Smith C, Dekkers JCM. 1993.** Results from a dispersed hybrid nucleus programme in dairy cattle. Anim Prod 57: 369-378.
  15. **Looney C. 1986.** Superovulation in beef females. In: Proc 5<sup>th</sup> AETA Annual Meeting, Texas, USA: American Embryo Transfer Association.
  16. **Martínez-González JC, Gutiérrez JF, Rosillo P, Lucero FA, Gutiérrez E. 2007.** Uso de dispositivos intravaginales de liberación de progesterona + eCG-PMSG en un protocolo de sincronización de vacas lecheras. En: XXX Reunión Asociación Peruana de Producción Animal. Cusco: APPA.
  17. **Moreira F, Orlandi C, Risco C, Lopes F, Mattos R, Thatcher W. 2000.** Pregnancy rates to a timed insemination in lactating dairy cows pre-synchronized and treated with bovine somatotropin: cyclic versus anestrus cows. J Anim Sci 78: 134 (Abstr).
  18. **Palma G. 2008.** Biotecnología de la reproducción. 2<sup>o</sup> ed. Mar del Plata: Producción Gráfica Integral. 669 p.
  19. **Rengifo O, Murga L, Vásquez M, Alvarez Y, Chipana O. 2011.** Efecto de dos dosis diferentes de eCG sobre la producción de embriones en vaquillas Holstein en condiciones tropicales. Spermova 1(1): 111-112.

20. **Silcox R, Powel K, Pursley J, Wiltbank M. 1995.** Use of GnRH to synchronize ovulation in Holstein cows and heifers treated with GnRH and prostaglandin. *Theriogenology* 43: 325 (Abstr).
21. **Stringfellow DA, Seidel G. 1990.** Manual of the International Embryo Transfer Society. 2<sup>nd</sup> ed. Illinois: IETS. 79 p.
22. **Taponen J. 2009.** Fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Acta Vet Scand* 51: 48-53.
23. **Tríbulo H, Bó GA, Gatti G, Tegli JC, Cutaia L, Moreno D, et al. 2000.** Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. In: XIV International Congress on Animal Reproduction. Sweden.
24. **Willmott N, Saunders J, Bó GA, Palasz A, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1990.** The effect of FSH/LH ratios in pituitary extracts on superovulatory response in the cows. *Theriogenology* 33: 347 (Abstr).