

CREACIÓN DE BANCO DE GERMOPLASMA VACUNO (embriones) DE RAZAS AUTÓCTONAS CRIOLLO LIMONERO Y SIBONEY EXISTENTES EN VENEZUELA.

Cattle germoplasma bank creation (embryos) obtaining in native breed Criollo Limonero and Siboney existing in Venezuela

Noris Roa¹, Ramón Denis², Andrés Domínguez², D'Endel D'Enjoy¹ y Carlos Marín³

¹Fisiología de la Reproducción Animal. Producción Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Maracay. Venezuela. e-mail: nroa@inia.gob.ve

² Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMA-GT). Cuba.

³ Laboratorio Bioinformática y Biometría. Producción Vegetal (INIA-CENIAP). Maracay. Venezuela

RESUMEN

Con el objeto de obtener embriones congelables de razas vacunas autóctonas existentes en Venezuela para su preservación, y observar su respuesta a un protocolo de sincronización y superovulación, se evaluaron 51 vacas, 34 Criollo Limonero (CrL) y 17 Siboney (Sib), ubicadas en el INIA-CENIAP Maracay, Venezuela. Se sincronizaron siguiendo el protocolo Pregnaheat-E[®] y fueron superovuladas con dosis descendentes de Folltropin V[®] (día 5: 100 mg; día 6: 60 mg; día 7: 40 mg; día 8: 20 mg), para ser inseminadas artificialmente a tiempo fijo (IATF) el día 9 (18:00 horas) y día 10 (6:00 h) del protocolo. Los embriones colectados (día 16), fueron clasificados según su morfología como transferibles: excelentes y buenos, regulares (Clase 1 y 2; IETS) y embriones congelables: excelentes y buenos (Clase 1). De 85 tratamientos superovulatorios aplicados, se obtuvieron 53 lavados para coleccionar embriones, representando 62,4% de respuesta a la superovulación (53/85=62,4%); con mayor respuesta no significativa, para la raza CrL (33/50=66,0%) en comparación con la Sib (20/35=57,1%) ($\chi^2=0,69$; $P=0,4068$). La evaluación de los embriones permitió comparar: n° total de estructuras colectadas (NTEC), n° de embriones transferibles (NET) y n° de embriones congelables (NEC). El NTEC en CrL fue 154 vs 147 en Sib, el NET resultó mayor significativamente en Sib (89=60,5%) que en CrL (74=48,1%) ($\chi^2=4,73$; $P=0,0297$); resultando no significativo el NEC en Sib (85=57,8%) vs CrL (70=45,5%) ($\chi^2=0,07$; $P=0,7887$). El promedio de embriones transferibles/vaca lavada, muestra una tendencia a ser mayor en Sib (4,5±1,0) vs CrL (2,2±0,4; $p>0,05$). Igualmente en el promedio de embriones congelables/vaca lavada, se observa la misma tendencia (Sib=4,3±0,8; CrL=2,1±0,4; $p>0,05$). Estos resultados permiten concluir que aunque las vacas CrL muestran una tendencia a responder mejor al protocolo de superovulación, las vacas Sib presentaron mayor número de embriones transferibles y/o congelables.

Palabras clave: Criollo Limonero, Siboney, embriones, superovulación, IATF.

ABSTRACT

With the intention to obtaining freezable embryos in existing native bovine breed in Venezuela to preservation, and observing their answer to synchronization and superovulation protocol, 51 cows were evaluated, 34 Criollo Limonero (CrL) and 17 Siboney (Sib), located in the INIA-CENIAP Maracay, Venezuela, were synchronized following the Pregnaheat-E protocol[®] and superovulated with descendent doses of Folltropin V[®] (day 5: 100 mg; day 6: 60 mg; day 7: 40 mg; day 8: 20 mg), and then artificially inseminations in time fixed (IATF) day 9 (18:00 hours) and day 10 (6:00 hours) of the protocol. The collected embryos (day 16), were classified according to their morphology like transferable: excellent and good, regular (Class 1 and 2; IETS) and freezable embryos: excellent and good (Class 1). From 85 applied superovulations treatments, 53 washings were obtained to collect embryos, representing 62.4% of the superovulation response (53/85=62.4%); with nonsignificant response, to CrL breed (33/50=66.0%) in comparison with the Sib (20/35=57.1%) ($\chi^2=0.69$; $P=0.4068$). The evaluation of the embryos allowed comparing: n° total of collected structures (NTEC), n° of embryos transferable (NET) and n° of freezable embryos (NEC). The NTEC in CrL was 154 versus 147 in Sib, the NET was greater significantly in Sib (89=60.5%) than in CrL (74=48.1%) ($\chi^2=4.73$; $P=0.0297$); and nonsignificant NEC in Sib (85=57.8%) versus CrL (70=45.5%) ($\chi^2=0.07$; $P=0.7887$). The average of transferable embryos/washed cow, shows a tendency to be greater in Sib (4.5±1.0) versus CrL (2.2±0.4; $p>0.05$). Also, in the average of freezable embryos/washed cow, is observed the same tendency (Sib=4.3±0.8; CrL=2.1±0.4; $p>0.05$). These results allow concluding that CrL cows show a tendency to respond better to the superovulation protocol, the Sib cows have presented greater number of transferable freezable embryos.

Key words: Criollo Limonero, Siboney, embryos, superovulation, IATF.

INTRODUCCIÓN

La Transferencia de Embriones tiene como principio la multiplicación acelerada de la progenie de hembras superiores genéticamente (Roa *et al.*, 1998). El uso de esta tecnología, tiene sus inicios en la década de los 70, pero en la actualidad resulta una técnica más accesible y con mejor aprovechamiento de las hembras donadoras que en el pasado, lo que permite producir un número de descendientes muy superior a lo que sería posible obtener fisiológicamente durante la vida reproductiva de la vaca (Taneja *et al.*, 2000). Por otra parte, ha sido demostrado que promueve el desarrollo de rebaños libres de enfermedades infecciosas, lo que resulta de gran interés para la exportación de embriones (Stringfellow *et al.*, 2004). Los resultados de los tratamientos superovulatorios durante el desarrollo de la técnica de transferencia de embriones han sido muy variables; sin embargo, en la búsqueda de mejoras para la producción de embriones se han sido diseñado protocolos que

sincronizan los eventos fisiológicos y endocrinos que ocurren durante el crecimiento folicular y la ovulación, a la vez que facilitan el manejo de las hembras donadoras. El uso de los tratamientos superovulatorios con Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) constituyen uno de estos alcances logrados. Aunque, la transferencia de embriones en fresco ha demostrado tener mejores resultados que los obtenidos con embriones congelados, la baja disponibilidad ocasional de hembras receptoras, hace que sea necesario mejorar la técnica hacia la producción de embriones con capacidad para ser criopreservados.

El presente estudio fue realizado con el objeto de evaluar la respuesta de hembras Criollo Limonero y Siboney, a un protocolo superovulatorio a través de la producción de embriones transferibles y congelables. Asimismo, crear un banco de germoplasma (embriones) para favorecer la preservación y aumento del número de hembras y machos de razas autóctonas en extinción como la Criollo

Limonero y Siboney entre otras, que aún existen en tres rebaños del INIA Venezuela, lo que se traduciría en aumento de la producción y productividad ganadera nacional, disminución de la importación de productos y subproductos de este rubro, así como la disminución del costo de producción de este tipo de ganado doble propósito con alta calidad genética.



Foto 1. Vacas donadoras siboney INIA CENIAP

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en tres (03) unidades de producción del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA Venezuela), ubicadas en los estados Aragua, Zulia y Barinas. Fueron seleccionadas como donadoras hembras entre 2–8 partos de las razas CrL (n=34) y Sib (n=17), con buenos índices productivos y reproductivos, con una condición corporal (CC) entre 3–4 ($3,6 \pm 0,1$) al momento de la selección (escala 1–5; ESCA. 1976). Para la sincronización se aplicó el protocolo Pregnaheat-E® (González, 2005): día 0: introducción de la esponja intravaginal impregnada de P₄, acompañada de la aplicación de 5 mL IM de Pregnaheat-E solución® (5mg de P₄ + 1mg Estadiol Benzoato/mL). El día 7, se removió la esponja de Pregnaheat-E, seguida de la aplicación de PGF_{2alfa} (150 µg de clorprostenol; Preloban® Intervet) IM. El día 8, se aplicó 1 mg IM de Benzoato de estradiol.

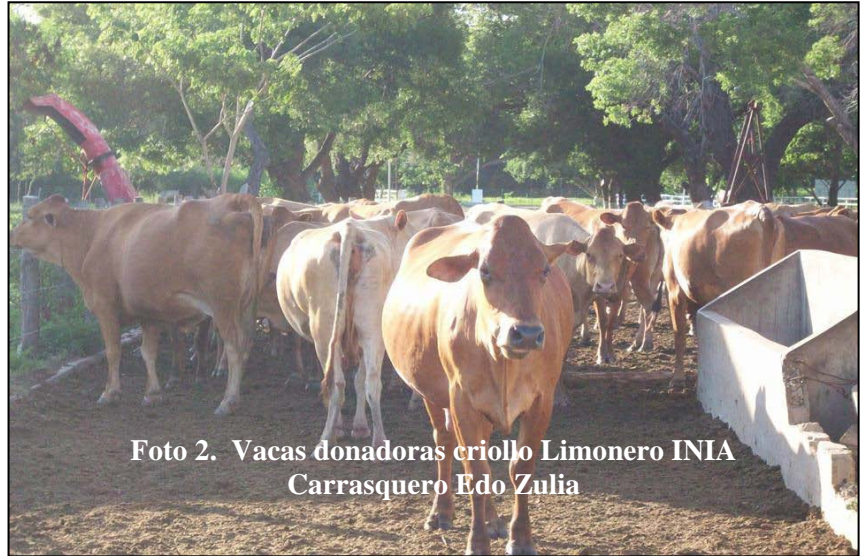


Foto 2. Vacas donadoras criollo Limonero INIA Carrasquero Edo Zulia

La superovulación de las vacas se realizó mediante el suministro de dosis descendentes de FSH (Folltropin V®) a intervalos de 12 horas, a partir del día 5 del protocolo (día 5: 50 mg de Folltropin-V 6:00 h + 50 mg 18:00 h. El día 6: 40 mg 6:00 h + 40 mg 18:00 h. El día 7: 20 mg 6:00 h + 20 mg 18:00 h. El día 8: 10 mg 6:00 h + 10 mg 18:00 h), para inseminarlas a tiempo fijo (IATF), con dos inseminaciones consecutivas (día 9: 18:00 h; día 10: 6:00 h). La colecta de embriones se realizó el día 16 del protocolo, solo en vacas que respondieron (≥ 3 CL's; Callejas *et al.*, 2005), determinada mediante palpación transrectal el día 15.

Para la recolección de los embriones, se siguió la metodología descrita por Mapletoft (2006), lavando los cuernos individualmente, con varias repeticiones, utilizando 500 mL de solución de lavado por cuerno (Complete Flush; Bioniche),

capturando los embriones en filtros de 75 micrones de



Foto 3. Vacas donadoras criollo Limonero INIA Carrasquero Edo Zulia

maya metálica. En el laboratorio, los filtros fueron lavados y se vació el contenido en una cápsula de petri cuadrículada para la búsqueda de los embriones en lupa a 10–20 X. Los embriones encontrados fueron pasados a placas de petri de cuatro posillos en medio de mantenimiento (Holding media; Bioniche) a temperatura ambiente, para ser contados y clasificados a 40X según la IETS (Stringfellow y Seidel, 2.000).

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa InfoStat®, 2002, en base al: número de embriones transferibles (NET; grado 1 y 2), número de embriones congelables (NEC; grado 1). Número total de estructuras colectadas (NTEC; grado 1, grado 2, grado 3 y grado 4). Las frecuencias de las respuestas al tratamiento de superovulación entre razas fueron analizadas con la prueba de ji cuadrado (χ^2).



Foto 4. Vacas donadoras mestizas criollo Limonero. INIA Barinas

realizó Prueba de T de student para muestras independientes.



Foto 5. Selección vacas criollo Limonero como donadora embriones. INIA Carrasquero Edo. Zulia

Para determinar si hubo diferencias entre medias se

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro 1, los cuales permiten señalar que existe un 62,4% de hembras que respondieron al tratamiento superovulatorio (presentaron ≥ 3 CL's a la palpación), siendo ligeramente superior la respuesta en vacas CrL (66,0%) en comparación con vacas Sib (57,1% $\chi^2=0,69$; $P=0,4068$). Asimismo, el número total de estructuras colectadas es superior en vacas CrL (154) en comparación con vacas Sib (147).

Cuadro 1. RESPUESTA AL TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO EN VACAS SIBONEY Y CRIOLLO LIMONERO.

	Criollo Limonero	Siboney	Total
N° de tratamientos superovulatorios	50	35	85
N° de lavados	33 (66,0%)	20 (57,1%)	53 (62,4%)
Total de estructuras colectadas	154	147	301
Total de embriones transferibles	74 (48,1%)	89 (60,5%)	163 (54,2%)
Total de embriones congelables	70 (94,6%)	85 (95,5%)	155 (95,1%)
Promedio de embriones/vaca sincronizada	3,1 ± 0,5	4,2 ± 1,0	3,5 ± 0,5
Promedio de embriones/vaca lavada	2,2 ± 0,4a	4,5 ± 0,8a	3,1 ± 0,4
Promedio de embriones congelables/vaca sincronizada	1,4 ± 0,3	2,4 ± 0,6	1,8 ± 0,3
Promedio de embriones congelables/vaca lavada	2,1 ± 0,4a	4,3 ± 0,8a	2,9 ± 0,4

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas.



Foto 6. Sincronización celo vaca donadora esponja intravaginal Pregna Heat_E

La respuesta superovulatoria observada en vacas CrL, hace que el número total de estructuras colectadas sea mayor (154) que en vacas Sib (147). Contrariamente, el número de embriones transferibles en las vacas Sib (89) resulta mayor al obtenido en vacas CrL (74; $\chi^2=4,73$; $P=0,0297$); al igual que el número de embriones congelables, en la que las vacas Sib mostraron una superioridad numérica no significativa (85) sobre vacas CrL (70; $\chi^2=0,07$; $P=0,7887$). Esto indica que las vacas Sib tienen una mejor respuesta al protocolo aplicado produciendo un mayor número de embriones de calidad 1 y 2 que las vacas CrL.

Considerando que el número de embriones transferibles y congelables son indicadores de la calidad de los embriones obtenidos, al comparar el número total de embriones transferibles vs congelables, del total de embriones transferibles (163), el 95,1% fueron congelables (155), mostrando la raza CrL un menor porcentaje de embriones congelables (94,6%) en comparación con la Sib (95,5%). González *et al.* (1997), observaron en vacas CrL, un número de embriones transferibles similar (60,5%) a lo obtenido en vacas Sib en este estudio. González *et al.*, (1997), obtuvieron con vacas Criollo Limonero, un menor porcentaje de embriones congelables (87%) a lo obtenido en el estudio para CrL y Sib. El promedio de embriones transferibles/vaca lavada, muestra una tendencia a ser mayor en vacas Sib ($4,5 \pm 1,0$) que en vacas CrL ($2,2 \pm 0,4$; $p > 0,05$), al igual que el promedio de embriones congelables/vaca lavada (Sib= $4,3 \pm 0,8$; CrL= $2,1 \pm 0,4$; $p > 0,05$). En general, el



Foto 7. Técnica de colocación cateter de Folley para recolección de embriones

promedio de embriones transferibles y congelables para ambas razas, resulto dentro del rango de embriones transferibles ($0,3 \pm 0,2 - 4,3 \pm 0,5$) y congelables ($0,06 \pm 0,1 - 3,0 \pm 0,4$) observado por Callejas *et al.* (2005) en vacas Angus utilizando protocolos superovulatorios basados en FSH y eCG.



Foto 8. Embriones colectados criollo Limonero

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Convenio bilateral internacional entre Venezuela (INIA-Ceniap, Responsable: Dra. Noris Roa) y Cuba (CIMAGT, Responsable: Dr. Andrés Domínguez), realizado durante los años 2006 al 2008, titulado: “Mejoramiento Genético de Bovinos de Doble Propósito”, en el INIA-Ceniap Venezuela, por los fondos provistos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CALLEJAS S.S, ALBERIO R, CABODEVILA J.A. DULOUT F., ALLER J., CATALANO R. 2005. El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de eCG como tratamiento superovulatorio en bovinos. **Rev. Argentina de Production Animal**. Vol. 25. P:63-73.
2. ESCA, East of Scotland College of Agriculture. (1976) Condition Scoring of cattle. Bulletin No. 6. Scotland, UK.
3. GONZÁLEZ R, VELARDE J.C., ZAMBRANO S., ESTE P. 1997. Producción y transplante de embriones congelados de bovinos Criollo Limonero. **Arch Latinoam Prod Anim** 5 (Supl. 1): 370-372.
4. GONZALEZ R. 2005. Como reducir los días vacíos. En: **Manual de Ganadería de Doble Propósito**. C. González-Stagnaro, E. Soto Beloso (eds). Ediciones Astro Data, SA. Maracaibo-Venezuela Cap. X. p: 456-459.
5. INFOSTAT 2002. InfoStat programa estadístico para ambiente Windows. <http://www.infostat.com.ar/>
6. MAPLETOFT R.J. 2006. Bovine Embryo Transfer. In: **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 17-Nov-2006; R0104.1106.
7. ROA N., LINARES T., RAMÍREZ DE ROLO M. AND TAMASAUKAS R. (1998). Reproductive Response of Crossbred Heifers (*Bos indicus* x *Bos taurus*) used as Bovine Embryo Recipients in Venezuela. **Journal of Reproduction and Development**. Tokyo University and Japanese Associate in Animal Reproduction. Japan. Vol: 44. N° 4. Nov. p: 367-370.
8. STRINGFELLOW D.A., GIVENS M.D., WALDROP J.G. 2004. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reprod Fert Dev**. 16:93-102.
9. STRINGFELLOW, D.A. y SEIDEL, S.M. 2000. Manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones. Guía de procedimientos e información general para el uso de la tecnología de la transferencia embrionaria con especial énfasis en los procedimientos sanitarios. Tercera Edición, 1111 North Dunla Avenue, Savoy Illinois, 61874 USA, P: 181.
10. TANEJA M., BOLS P.E.J., VELDE V. 2000. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology Reproduction**. 62(1): 206-213.