

Porcentaje de concepción gemelar en el ganado bovino con la utilización de embriones *in vitro* F1 (Brahman x Angus) con semen sexado

Percentage of twin conception in cattle with the use of F1 in vitro embryos (Brahman x Angus) with sexed semen

HORACIO RUIZ HERNÁNDEZ ^{1*}, HORACIO LEÓN VELASCO ¹, ALFONSO DE J. RUIZ MORENO ¹,
ÓSCAR LEÓN VELASCO ¹ Y VERA BERNARDA PALACIOS RAMOS ²

¹Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Km.8 carretera Tuxtla-Ejido E. Zapata.

² Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical. Universidad autónoma de Chiapas.

*Correo electrónico: ruiz.62@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la inducción de gestaciones gemelares en el ganado bovino en el trópico con la utilización de embriones *in vitro* (Brahman x Angus) con semen sexado. Este estudio se realizó en las regiones Frailesca y Norte del estado de Chiapas. Se utilizaron 48 vacas receptoras y un total de 96 embriones, de los cuales 56 fueron de sexo macho y 40 de sexo hembra. Las vacas receptoras se sincronizaron con un dispositivo intravaginal con concentraciones de 1 g de progesterona durante 8 días, dos días después de retirado el dispositivo se presentó el estro y a los 7 días posteriores se realizó la transferencia de dos embriones del mismo sexo por vaca receptora, en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. Los datos de porcentaje de gestación se analizaron mediante la prueba estadística de Ji Cuadrada. El porcentaje total de gestaciones fue del 19%, siendo el 15% para gestaciones simples y el 4.2% para gestaciones gemelares ($P>0.05$). Por otra parte, a pesar de que se obtuvieron mayores porcentajes de gestación en vacas con una condición corporal de 3.0 y vacas de dos partos, los porcentajes de concepción no fueron afectados por la raza, condición corporal, edad y el número de partos ($P>0.05$). Por lo anterior, se concluye que los resultados de este estudio son similares a los observados por otros autores en condiciones tropicales. Sin embargo, sigue siendo un punto crítico para la óptica y la rentabilidad de los productores este bajo índice de concepción. Así mismo, se demuestra la necesidad de realizar más trabajos sobre esta línea de investigación, tomando en cuenta el manejo, medio ambiente, sanidad; enfatizando en la nutrición animal que juega un papel básico en la aplicación de esta biotecnología reproductiva.

Palabras clave: inducción gemelar, selección del sexo, parto simple y gemelar.

INTRODUCCIÓN

Sin lugar a dudas, algunos beneficios que proporciona la selección del sexo en los animales, radica en acelerar el mejoramiento genético, sobre todo en los sistemas de producción de carne y leche que requieren de la obtención de crías. Los productores dedicados a la producción de leche demandan el nacimiento de hembras para reemplazo, mientras las productoras de carne necesitan que la mayoría de sus crías sean de sexo macho, debido a que crecen más

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the induction of twin pregnancies in cattle in the tropics with the use of *in vitro* embryos (Brahman x Angus) with sexed semen. This study was carried out in the Frailesca and Northern regions of the state of Chiapas. We used 48 recipient cows and a total of 96 embryos, of which 56 were male and 40 female. The recipient cows were synchronized with an intrafemale device with concentrations of 1 g of progesterone for 8 days, two days after the device was removed the estrus was presented and at 7 days later the transfer of two embryos of the same sex per recipient cow, in the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum. Percentage gestation data were analyzed using the Ji Square statistical test. The overall percentages of pregnancies were 19%, 15% for simple gestations and 4.2% for twin pregnancies ($P>0.05$). On the other hand, although higher gestation rates were obtained in cows with a body condition of 3.0 and cows with two parity's, conception percentages were not affected by breed, body condition, age and number of births ($P>0.05$). Therefore, it is concluded that the results of this study are similar to those observed by other authors in tropical conditions. However, it remains a critical point for the optics and profitability for producers the low conception rate. Likewise, it is demonstrated the need to carry out more work on this line of research, taking into account the management, environment, health; Emphasizing on animal nutrition that plays a basic role in the device of this reproductive biotechnology.

Key words: twin induction, sex selection, simple and twin birth.

rápido y la ganancia de peso es más eficiente. De esta manera, se ahorra tiempo en la obtención de los animales que requiere la explotación, generando crías con el sexo deseado. En general, la proporción de sexos de manera natural o con la utilización de la inseminación artificial (IA) es de 50% machos y 50% hembras (Zamudio et al., 2004).

El uso del semen sexado en la producción de embriones *in vitro* (PIV) por compañías comerciales ha aumentado y actualmente representa un considerable porcentaje del número total de embriones producidos en algunos países como Brasil, Colombia y Argentina. Esta biotecnología avanza a un ritmo acelerado,

mientras la transferencia de embriones (TE) convencional está en declive, por lo que, en un futuro cercano la PIV se puede convertir en la técnica preferida por los ganaderos para sus programas de mejoramiento genético.

En los últimos años, en México se ha incrementado el uso de estas biotecnologías reproductivas, como ejemplo se tiene al estado de Chiapas, que cuenta con empresas ganaderas las cuales obtienen crías por medio de estas técnicas. No obstante, es necesario realizar investigaciones sobre la eficiencia reproductiva que implican estas biotecnologías de los embriones sexados y la utilización in vitro en el trópico mexicano. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el porcentaje de concepción gemelar en el ganado bovino en el trópico con la utilización de embriones in vitro (Brahman x Angus) con semen sexado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en las regiones Frailesca y Norte del Estado de Chiapas. Esta entidad se localiza en sureste de la República Mexicana, con las siguientes coordenadas: al norte 17°58', al sur 14°32' de latitud norte; al este 90°22', al oeste 94°07' de longitud oeste. Está dividido en 15 regiones económicas principalmente para las actividades agropecuarias, forestales y turísticas (INEGI, 2011).

Se utilizaron 48 vacas receptoras, de las cuales 29 pertenecieron a la raza Pardo Suizo y 19 encastadas de Cebú X Suizo. La condición corporal de las vacas fue de 2.8 ± 0.23 , en una escala del 1 al 5 (donde 1.0 = muy flaca y 5.0 = obesa (Ferguson et al., 1994). El número de partos fue de 2.0 ± 0.7 por animal, y un rango de 36 a 60 meses de edad con una producción de leche de 7.2 ± 0.51 litros/día. Las vacas

tuvieron una alimentación a base de pastoreo en potreros con pasto Estrella Africana (*Cynodon plectostachyus*). Además se brindó un periodo de complementación de 30 días previo al trabajo y durante el desarrollo de la investigación alimento comercial con el 16% de Proteína Cruda, se ofrecieron 4 kg por animal/día, agua limpia y sales minerales a libre acceso.

Las vacas receptoras fueron seleccionadas por su actividad ovárica, libre de alteraciones anatómicas en el aparato reproductor y de infecciones clínicas que pudieran afectar la fertilidad, esto se confirmó a través de palpación transrectal y ecografía del aparato reproductivo.

Protocolo de sincronización de estro

Para la sincronización de estros de las vacas receptoras se utilizó el siguiente tratamiento hormonal. Al inicio del programa (día 0) se les aplicó a cada receptora un dispositivo intravaginal con concentraciones de 1 g de progesterona (P4), el mismo día se aplicó 1 mg de benzoato de estradiol vía intramuscular (IM). Ocho días después se retiró el dispositivo intravaginal y al mismo tiempo se le administró a cada animal 500 µg de cloprostenol sódico vía intramuscular, 0.5 mg de cipionato de estradiol y 400 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG) de manera intramuscular, observándose la manifestación del estro el día 10 del programa (Figura 1).

Embriones in vitro

Los embriones utilizados en este estudio fueron adquiridos de manera comercial a una empresa dedicada a la producción de embriones in vitro. Los embriones se encontraban en estadios de mórulas compactas y blastocistos expandidos de calidad buena. En total se uti-



Figura 1. Representación esquemática del experimento

lizaron 96 embriones *in vitro* F1 (Brahman x Angus), de los cuales 56 fueron de sexo macho y 40 de sexo hembra.

Transferencia de embriones

El día 17 del programa o el día 7 del ciclo estral las vacas fueron examinadas por palpación transrectal (Figura 1). Previo a esto se retiraron las heces del recto y la zona perineal se lavó con agua limpia. Las vacas que presentaron un buen cuerpo lúteo, recibieron anestesia epidural (5 mL de lidocaína al 2%) para disminuir el peristaltismo y el malestar durante el proceso. Al mismo tiempo, los embriones se transportaron en un termo a una temperatura de 35 °C en un medio de cultivo. Los embriones se evaluaron morfológicamente mediante observación con un microscopio estereoscópico, posteriormente se realizó el empajillado colocando dos embriones del mismo sexo, en cada pajilla francesa de 0.25 mL. El objetivo de transferir dos embriones fue obtener gestaciones gemelares y del mismo sexo. Después de 2 a 3 min aproximadamente, se procedió a realizar la transferencia de los embriones *in vitro* al cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. Para la región Frailesca se transfirieron un total de 40 embriones de sexo hembra en 20 vacas y para la región Norte se utilizaron 56 embriones de sexo macho en 28 vacas (Cuadro 1).

Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía transrectal 60 días después a la transferencia, con la finalidad de identificar gestaciones simples o gemelares. El sexo de las crías se determinó hasta el momento del nacimiento.

Análisis estadístico

Para determinar la diferencia estadística obtenida entre las tasas de gestación con embri-

Cuadro 1. Número de embriones transferidos en cada región económica

Regiones	No. de vacas	No. de embriones	Sexo
Norte	28	56	Machos
Total	48	96	

nes *in vitro* sexados, se realizó la prueba de Ji Cuadrada utilizando el programa estadístico SPSS versión 19. Las variables evaluadas fueron: gestación, porcentaje de crías nacidas, número de partos simples y gemelares

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la aplicación de 96 embriones a 48 vacas receptoras, para la inducción de gestaciones gemelares a través de embriones producidos *in vitro* con semen sexado, fue en general del 19% (n=9) de concepción, de los cuales el 15% (n=7) fue para gestaciones simples, donde cuatro fueron del sexo macho y tres del sexo hembra y el 4% (n=2) para gestaciones gemelares siendo cuatro del sexo macho (P>0.05) (Cuadro 2).

Con referencia a los nacimientos gemelares en ganado bovino en forma natural varía entre un 1 y 5% dependiendo principalmente de la raza, edad y condiciones ambientales (Morris, 1984). Sin embargo, para lograr gestaciones dobles en forma natural e inducida en el ganado vacuno han sido, utilizando por un lado, la selección genética y por otro lado, el uso de biotecnologías reproductivas como por ejemplo, la inseminación artificial en el día del estro y a los siete días después la transferencia de un embrión. Otro método que se puede utilizar es la transferencia de dos embriones ipsilateral al cuerpo lúteo o la bipartición de embriones, así como también el uso de ovulación múltiple con altas dosis de gonadotropinas (Jiménez, 2015). Estos métodos sus resultados son muy variados por lo que actualmente solo se realizan de manera experimental y con objetivos de investigación.

Otros autores han utilizado diferentes métodos de aplicación de los embriones. Sreenan y Beehan (1976) quienes trabajaron con ga-

Cuadro 2. Resultados de gestaciones simples y gemelares en vacas en condiciones tropicales

Región	Número de vacas transferidas	Embriones transferidos	Número de gestaciones		NCN	Sexo de crías
			Simples	Gemelares		
Frailesca	20	40	4 ^a	0 ^a	4 a	♀
Norte	28	56	3 ^a	2 ^a	7 a	♂
Total:	48	96	7	2	11	11

NCN= Número de crías nacidas

^a= literales iguales en la misma columna indican que no existen diferencias significativas (P>0.05)

nado bovino de razas de carne y observaron que la pérdida de embriones después de la transferencia en forma bilateral ocurrió temprano en lugar de llegar al final de la preñez. En consecuencia a lo anterior, se observó una alta incidencia de aborto (28%) en un grupo de vaquillas de carne al transferir embriones en forma bilateral, incluyendo varios abortos durante el último trimestre de gestación (Anderson et al., 1978). Sin embargo, Anderson et al. (1979) realizaron con éxito esta metodología en un grupo de vacas y novillas de la raza Hereford. En resumen, se puede deducir que existe siempre un alto riesgo de problemas reproductivos en gestaciones gemelares.

Anderson et al. (1982) quienes evaluaron la aplicación de 175 transferencias de embriones dobles en forma bilateral en vaquillas y vacas de las razas Angus, Hereford y F1 (Angus X Hereford), observaron un 70.1% de preñez temprana (<45 días) y el 89.4% de las vacas parieron con 62 partos gemelares (56.4%). En este estudio, de los 96 embriones *in vitro* sexado y transferidos a 48 vacas receptoras, se obtuvo el 4% de partos gemelares y el 15% de partos simples. Como se puede apreciar los resultados obtenidos en este estudio, son muy bajos comparado a los encontrados por estos autores. Cabe aclarar, que los embriones utilizados por estos autores son embriones producidos *in vivo* y no sexado e *in vitro*, posiblemente esta sea la diferencia entre estos resultados. Al respecto, en el trabajo realizado por estos investigadores, se presentó más retención placentaria en partos dobles que simples y la incidencia de distocia fue mayor en vaquillas de partos gemelares que aquellas de partos individuales. Este método de inducción gemelar puede encontrar quizás la aplicación en la producción de bovinos de razas de carne y como consecuencia aumentar el número de crías por parto.

Por otra parte, Silva et al. (2000) quienes trabajaron con 60 vacas receptoras con el método de inseminación artificial en el día del estro y a los siete días después la transferencia de un embrión, de esto, 32 vacas recibieron los embriones ipsilateral al cuerpo lúteo y 28 vacas fueron transferidas por el sistema con-

tralateral. La tasa de preñez a los 90 días en el grupo ipsilateral fue del 62.5% (n=20), de las cuales el 45% (n=9) fueron de gestaciones dobles y en el grupo contralateral el 45% de gestaciones (n=21), de estas solo el 4.8% (n=1) fue de preñez doble. Al comparar el número de gestaciones dobles a los 90 días con otros trabajos, se observó que el 4.8% obtenido en el grupo contralateral es muy inferior a los resultados del 42% obtenidos por Reichenbach et al. (1992). A su vez el valor de 45% obtenido en el grupo de transferencias ipsilaterales, es similar al reportado por Reichenbach et al. (1992) quienes observaron un 33% de gestaciones dobles, mientras que Wilkins et al. (1992) reportaron el 66%. De igual forma, los resultados obtenidos en este estudio son inferiores a los encontrados por estos investigadores, posiblemente se deba los métodos de inducción gemelar utilizado y a las condiciones medioambientales que prevalecen en las zonas tropicales donde se desarrolló el presente estudio. De acuerdo a lo descrito, se puede decir, que la transferencia de un segundo embrión al cuerno uterino ipsilateral de vacas previamente preñadas es un método más efectivo de inducción de mellizos que la transferencia contralateral e ipsilateral al cuerpo lúteo (Silva et al., 2000).

Los porcentajes de gestaciones con embriones producidos por fertilización *in vitro*, son muy variados de acuerdo a las condiciones medioambientales de cada estudio. En este trabajo, se aplicaron dos embriones obtenidos *in vitro* con semen sexado por cada vaca receptora en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo, logrando con esto 15% de partos simples y el 4% de partos gemelares. Por su parte, Aller et al. (2000) compararon embriones *in vitro* congelados de 7 y 8 días de desarrollo, después de transferir dos embriones por vaca receptora; estos investigadores encontraron el 16.6% de gestación para embriones de 8 días y el 35.5% para embriones de 7 días. De igual forma, en un estudio realizado por Gutiérrez et al. (2001) transfirieron embriones *in vitro* frescos vs. congelados y se transfirió un embrión por vaca receptora, alcanzando tasas de preñez del 20 y 0% respectivamente. En

el mismo sentido, otros autores compararon embriones *in vitro* congelados y vitrificados, únicamente se registraron el 20% de preñez con los embriones vitrificados (Hidalgo et al., 2002). Como se puede observar existen diferencias significativas con algunos autores y en otros no hay diferencia en los resultados, esto podría ser por el método de concepción gemelar utilizado y las condiciones medioambientales que prevalecen en la zona.

Pontes et al. (2009) reportaron en un estudio realizado en Brasil, sobre la comparación de embriones producidos *in vivo* e *in vitro* obtenidos de donadoras de la raza Nelore y transferidos a vacas encastadas, obtuvieron el 41.5% de gestaciones simples para embriones *in vivo* y el 33.5% de preñez para embriones *in vitro*. Al comparar el trabajo realizado por estos autores con los resultados del presente estudio, se puede deducir que existe un amplio margen de diferencia de preñez (19%). Sin embargo, Algunas publicaciones afirman que la tasa de gestación con un embrión por vaca receptora producidos *in vitro*, gestaciones con dos embriones *in vitro* por receptora, independientemente del método de transferencia bilateral, contralateral, ipsilateral son a menudo inferiores que las obtenidas con embriones producidos por el sistema convencional en la producción de embriones (Franco et al., 2006; Ferré y Cattaneo, 2013).

CONCLUSIONES

La producción de embriones *in vitro* junto con el uso de semen sexado, podría ser una alternativa para obtener crías con el sexo deseado; sin embargo, las tasas de gestación que se obtienen aún no permiten que la técnica sea eficiente en términos productivos y de rentabilidad de la empresa. Los resultados de este estudio, se encuentran dentro del rango obtenido por otros autores; sin embargo sigue siendo un punto crítico para la óptica y la rentabilidad de los productores.

Sin lugar a dudas, es necesario realizar más trabajos sobre esta línea de investigación, tomando en cuenta el manejo, medio ambiente, sanidad, utilizar receptoras jóvenes, poniendo mayor énfasis en la nutrición, que juega un

papel básico en la aplicación de esta biotecnología reproductiva. Al ser perfeccionada esta técnica en todos los aspectos, se logrará mayor porcentaje de preñez y será mejor adoptada entre los productores.

REFERENCIAS

- Anderson, G. B.; Bon Durant, R. H. & Cupps, P. T. (1982). Induction of twins in different breeds of cattle. *Journal Animal Science*. 54(3):485-90
- Anderson, G. B.; Cupps, P.T. & Drost, M. (1979). Induction of twins in cattle with bilateral and unilateral embryo transfer. *Journal Animal Science*. 49: 1037.
- Anderson, G. B., Cupps, P.T.; Drost, M.; Horton, M.B. & Wright, R.W. Jr. (1978). Induction of twinning in beef heifers by bilateral embryo transfer. *Journal Animal Science*. 46:449.
- Aller, J.F.; Alberio R.H. & Palma, G.A. (2000). Gestación con embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. *Archivos Medicina Veterinaria*. 32:1-8
- Ferguson, J.D.; Galligan, D.T. & Thomsen, N. (1994). Principal descriptors of body conditions score in Holstein cows. *Journal Dairy Science*. 77 (9): 2695- 2703
- Ferré, L & Cattaneo, L. (2013). Biotecnologías reproductivas: Producción *in vitro* de embriones y semen sexado. *Revista Medicina Veterinaria*. 94 (2): 28-36
- Franco, M.; Block, J.; Jousan, F.D.; de Castro e Paula L.A.; Brad, A.M.; Franco, J.M.; Grisel, F.; Monson, R.L.; Rutledge, J.J. & Hansen, P.J. (2006). Effect of transfer of one or two *in vitro*-produced embryos and post-transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle. *Theriogenology*. 66:224-233
- Gutiérrez, C.; Cifuentes, E.; Pérez, V. R.; Romero, L.; Martínez N.H. & González M.T. (2001). Transferencia de embriones fecundados *in vitro* en ganado bovino de doble propósito. *MVZ Córdoba*. 6(1): 52-57
- Hidalgo, C.O.; Fernández I.; Duque P.; Facal, N.; Díaz, E.; Prendes, J.M.; Menéndez, J.; Gómez, E.; Prieto, L. & Diez, C. (2002). Primeros terneros producidos *in vitro* tras punción ecoguiada de folículos ováricos. *Archivo Zootecnia*. 51: 411-422
- Instituto de Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2011). Anuario estadístico de Chiapas.
- Jiménez, A. (2015). Desarrollo de un protocolo de sincronización para inducir gestaciones dobles en vacas de carne. *Ceva Salud Animal*
- Morris, C. A. (1984). A review of the genetics and reproductive physiology of dizygotic twinning in cattle. *Animal Breeders Abstract*: 52: 803
- Pontes, J.H.F.; Nonato, J.I.; Sanchez, B.V.; Ereno, J.J.C.; Uvo, S.; Barreiros, T.R.; Oliveira, J.A.; Hasler, J.H. & Sedena, M.M. (2009). Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the some nelore (*Bos indicus*) donors cows. *Theriogenology*. 71: 690-697
- Reichenbach, H. D.; Leibrich, J.; Berg, U. & Brem, G. (1992). Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal Reproduction Fertility*. 95: 363-370.
- Silva, M.E., Gatica, R. & Correa J.E. (2000). Inducción de mellizos mediante la transferencia de un segundo embrión isilateral o contralateral al cuerpo lúteo en vacas cubiertas. *Archivos Medicina Veterinaria* 32(1): 41-48
- Sreenan, J. M. & Beehan, D. (1976). Embryonic survival and development at various stages of gestation after bilateral egg transfer in the cow. *Journal Reproduction Fertility*. 47:127.
- Wilkins, J.F.; Hennessy, D.W.; Cummins, L.J. & Hillard, M.A. (1992). Twin calves for commercial beef production in Australia. Yamaguchi. *Journal Veterinary Medicine*. 19: 67-72.
- Zamudio, N.A., Herrera, H.J.G.; García, W.M.; Gallegos, S.J.; Sánchez A.A. & Valencia, M.J. (2004). Factores que afectan la proporción de sexos en becerros provenientes de transferencia de embriones. *Agrociencia*. 38(4): 405-41.