

RESULTADOS DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES CONGELADOS Y FRESCOS EN NOVILLAS HOLSTEIN-CEBÚ, REGIÓN DE AZUERO (Bosque Tropical Seco). 1999.

Reinaldo de Armas R.¹; Luis F. Pérez ²

RESUMEN

En el presente estudio se transfirieron 73 embriones, de los cuales 25 eran embriones frescos, mientras los 48 restantes eran embriones congelados, importados de Australia. Los embriones frescos se colectaron a partir de vacas superovuladas, bajo condiciones de la finca del productor. Los embriones congelados fueron tratados con tres pases de 10 minutos cada uno, a concentraciones descendentes de glicerol + sacarosa (1: 6% de glicerol + 10.3% de sacarosa; 2: 3% de glicerol + 10.3% de sacarosa y 3: 6% de glicerol + 10.3% de sacarosa). La transferencia de embriones se efectuó en un mismo hato de receptoras, mantenidas bajo condiciones similares de manejo y alimentación (novillas de cruzamiento Holstein x Cebú, de 22 a 30 meses de edad y >400 kg de peso vivo. La sincronización receptora donante fue de +1 ó 0 con relación al día del celo superovulatorio, mientras que la edad embrionaria, en todos los casos, fue de siete días. Se consideraron como variables a estudiar: Tipo de embrión (fresco o congelado), época del año (I: enero a mayo y II: junio a diciembre) y día tiempo de sincronización (+1 ó 0 días). Los resultados de preñez alcanzados fueron de 31.25% (15/48) para los embriones congelados y de 60% (15/25) para embriones frescos ($P<0.05$). Los mejores resultados de preñez por época, se lograron de enero a mayo (I: 51.52% vs II: 32.5%); se evidenció diferencias significativas ($P<0.05$) en el tipo de embrión por época, para el caso de los embriones congelados (I: 45% vs II: 21.43%), mientras que no hubo diferencias con los embriones frescos (I: 61.54% vs II: 58.33%). Con relación al tipo de embrión y estado de sincronización receptora donante, a pesar de que no se pudo comprobar estadísticamente diferencias significativas, hubo una tendencia matemática similar a la del tipo de embrión por época (embriones congelados, 40% (6/15) y 27.3% (9/33); embrio

¹ Ph.D., Dr. Méd. Vet. Estación Experimental de Gualaca. CIAOC. IDIAP. Actual Director Nacional de Investigación Pecuaria. e-mail: araletsa@cwpa.net.pa

² Ing. Zoot. Industrial Agropecuaria, S.A. Herrera, Rep. de Panamá.

nes transferidos frescos, 75% (6/8) y 69.2% (9/13), para los días + 1 y 0, respectivamente. Se concluye que para incrementar los resultados de preñez con embriones congelados, bajo las condiciones climáticas de la Región de Azuero, República de Panamá, se debe realizar las transferencias durante el período de enero a mayo y se propone ensayar el empleo de receptoras con un día más (+ 1 día) de intervalo celo transferencia que las donadoras.

PALABRAS CLAVES: Vaca; parto; heredabilidad; leche; producción; nutrición animal; pastoreo; Panamá.

EMBRYO TRANSFER RESULTS OBTAINED WITH FRESH AND FROZEN EMBRYOS IN THE REGION OF AZUERO (Tropical dry forest). 1999.

At the present study 73 embryos were transferred, from which 25 were fresh embryos and the rest (48) were frozen embryos imported from Australia. Fresh embryos were collected from superovulated cow under farm conditions. Frozen embryos were thawed in three steps (10 minutes each) in decreasing glycerol concentrations + constant amount of sucrose (1: 6% glycerol + 10.3% sucrose; 2: 3% glycerol + 10.3% sucrose and 3: 6% glycerol + 10.3% sucrose). All embryos were transferred in the same recipients herd (F-1, Holstein X Zebu heifers, ages between 22 to 30 month and averagebody weight of 400 kg), keep under the same management and feeding conditions. Recipient synchronization was +1 and 0 in relation to superovulatory estrous in donors cows mean while embryo age was in all cases 7 days. The variations factors studied were: embryo source (fresh or frozen), period of the year (I: January to May and II: June to December) and synchronization time (day + 1 or 0). The pregnancy results were 31.25% with frozen embryos (15/48) and 60% (15/25) with fresh embryos ($P < 0.05$). According to the period of the year in which transfers were performed results shown in period I: 51.52% vs II: 32.5%, correlating source of embryos and period of the year, frozen embryos shown significant differences ($P < 0.05$) between periods (I: 45% vs II: 21.43%); however, fresh embryos did not show the same behavior (I: 61.54 vs II: 58.33%). In relation to the source of embryo and recipient - donor synchronization nevertheless nor statistical differences were proved a similar mathematical tendency was observed as in the previous results for source of embryo - period of the year. The pregnancy results were 40% (6/15) and 27.3% (9/33) for frozen embryos in days + 1 and 0, respectively; on the other hand, fresh embryos transferred on days + 1 risk 75% (6/8) as well as 69.2% (9/13) obtained for those transferred on day 0. We concluded that for increasing embryo transfer results under the Azuero climatic conditions in Panama, transfers should be performed during the months of January to May and is proposed to study the use of embryo recipients with one day in advance (day + 1) in reference to the superovulatory estrous in the embryo donors.

KEYWORDS: Cow; calving; heritability; milk; production; animal nutrition; grazing; Panama.

INTRODUCCIÓN

La técnica de transferencia de embriones tiene su origen en los trabajos realizados por Walter Heape, a finales del siglo XIX, caracterizada por su creciente popularidad, alcanzada por las bondades de la técnica en la reproducción de los animales de mayor valor productivo, con su incuestionable impacto en la mejora genética. En Panamá, se han desarrollado algunos trabajos, de forma aislada, sin contar hasta el momento con resultados publicados.

Diferentes autores (Niemann 1991; Palma y Brem, 1993; de Armas y Solano, 1996) han considerado la importación de embriones, en forma congelada, como una de las posibilidades más interesantes que brinda la transferencia de embriones. Esto permite introducir razas exóticas o de zonas distantes, disminuyen los costos de transporte y cuarentena que limitan la importación de animales vivos. Además, disminuye los riesgos de introducción de enfermedades no existentes en el área y salva los problemas de adaptación al nuevo ambiente, ya que los terneros

producidos a partir de embriones congelados, nacerán en vientres autóctonos del lugar donde van a desarrollarse. De esta manera, comienza su adaptación desde el mismo útero y recibiendo, al nacer, vía madre receptora, las inmunoglobulinas necesarias para iniciar su vida. Por otro lado, es importante emplear esta técnica en la reproducción intensiva de las hembras más productivas del rebaño nacional, ya que estos animales han demostrado su productividad y adaptabilidad al medio ambiente local.

Este estudio, realizado en la Región de Azuero, trata de mostrar los resultados alcanzados en la transferencia de embriones frescos, obtenidos localmente, y congelados importados.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en la Región de Azuero, en una granja dedicada a la producción de leche, en un área considerada como Bosque Tropical Seco (Tosi, 1971).

Para la producción de embriones frescos se emplearon hembras de cruzamiento lechero ($\frac{3}{4}$ Pardo Suízo X Cebú y $\frac{3}{4}$ Holstein X Cebú), las cuales fueron superovuladas en la fase media luteal (días 10 al 12) con una dosis total de 40 ui de FSH de origen porcino (Folltropin-V, Veterpharm, Canadá), aplicada en ocho inyecciones de 5 ui cada una a intervalos de 12 horas entre aplicación; en coincidencia con la quinta aplicación de FSH se le suministró 25 mg de un análogo de la prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Lutalyse, Upjon, USA).

La inseminación artificial (IA) se practicó dos veces, a las 12 y 24 horas de iniciado el estro, con una dosis de semen por servicio de IA. La colecta de los embriones se realizó no quirúrgicamente a los siete días después del estro superovulatorio. Los embriones colectados fueron evaluados bajo visión estereoscópica, según criterio morfológico en la misma finca donde se realizaron las colectas. Aquellos clasificados como transferibles se embalaron individualmente en pajillas (0.25 ml) y se trasladaron a temperatura corporal



Búsqueda de Embriones

(36°C) hacia el hato de receptoras, mediando un tiempo promedio de 4 a 6 horas de la colecta hasta la transferencia.

Los embriones importados en forma congelada fueron obtenidos a partir de donadoras de la raza AFS (Frisian X Sahiwal Australiana, Reproduction Artificial Breeding, Ltd., Australia) y la congelación realizada en un solo pase por glicerol al 10%. La descongelación se desarrolló por 15 seg, en aire, a temperatura ambiente (22°C) y, posteriormente, en agua a 25°C por otros 15 seg y sometidos a la extracción del crioprotector en tres pases de 10 min cada uno, antes de ser colocados en el medio de transferencia:



- 1er Pase:** 6% de glicerol + 10.3% de sacarosa.
- 2do Pase:** 3% de glicerol + 10.3% de sacarosa.
- 3er Pase:** 0% de glicerol + 10.3% de sacarosa.



Mórula de excelente calidad después de la descongelación y el retiro del crioprotector.

Una vez evaluados los embriones morfológicamente, bajo visión estereoscópica, los mismos fueron colocados en pajillas (0.25 ml) para su transferencia a las hembras receptoras, en un intervalo de tiempo entre 1 y 2 horas.

Como receptoras, para ambos tipos de embriones, se emplearon novillas cruzadas (Holstein X Cebú) de una edad entre 22 y 30 meses, con un peso vivo promedio de 400 kg. Estas hembras conformaban un hato que se mantuvo bajo las mismas condiciones de tenencia y manejo. Durante este período, se les suministró una suplementación de 5 kg de melaza con 2% de urea y 10% de torta de soya, sobre la base alimenticia de pasto mejorado (*Brachiaria decumbens* y *Digitaria swazilandensis*). El celo fue detectado por observación directa de un hombre, dos veces al día (mañana y tarde).

Las transferencias se realizaron no quirúrgicamente y la sincronización receptora donante fue de +1 a 0 días (8 ó 7 días después de detectado el estro). El

diagnóstico de gestación fue practicado a los 60 días por palpación transrectal del útero.

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa SAS y se trabajó con un nivel de significación de $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las ocho vacas sometidas a superovulación, respondieron seis, las cuales fueron lavadas y se obtuvo un total de 32 huevos. De ellos, 24 fueron clasificados como transferibles (seis fueron blastocistos y 18 mórulas compactas), mientras los restantes ocho no se encontraban aptos para

la transferencia (cinco no fecundados y tres retrasados degenerados). Los resultados se presentan en el Cuadro 1.

En cuanto al porcentaje de respuesta a la superovulación (75%), los resultados fueron similares a los descritos por diferentes autores (Donaldson, 1984; Mapletoft y col., 1987) para hembras lecheras con el empleo de la hormona foliculo estimulante (FSH). En lo referente a la \bar{X} de embriones producidos por donantes resultó ligeramente inferior a los publicados por Price y col., 1999 (5.2); Ochio y col., 1999 (5.8) y Kawamata, 1999 (4.8), bajo condiciones de clima templado.

Al ser comparados con estudios desarrollados bajo condiciones

CUADRO 1. RESULTADOS DE LA SUPEROVULACIÓN Y COLECTA DE EMBRIONES.

| Donantes Superovuladas (DS) | Donantes Lavadas (DL) | Porcentaje de Respuesta | Huevos Colectados | | | Huevos Transferibles | | |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|------|------|----------------------|------|------|
| | | | No. | (DS) | (DL) | No. | (DS) | (DL) |
| 8 | 6 | 75 | 32 | 4 | 5.3 | 24 | 3 | 4 |

DS: Donantes superovuladas.

DL: Donantes lavadas.

parecidas, en áreas tropicales (de Armas y Solano, 1996) no hubo diferencias (4.04). De tal forma que, teniendo en cuenta que las hembras superovuladas en este estudio se encontraban en diferentes fincas, bajo condiciones de explotación práctica, sin recibir tratamientos especiales por su condición de donadoras de embriones, estos resultados fueron satisfactorios y pudieran ser incrementados en la medida que se implementen políticas preferenciales de alimentación y manejo para las donantes de embriones, en concordancia con lo planteado por Solano y col. (1992) y Mapletoft y col. (1993).

Los resultados de preñez logrados en este estudio, después de la transferencia de embriones frescos, a pesar de ser menores en la época II (I:61.54 vs II:58:33), no presentaron diferencias significativas estadísticamente entre épocas y se corresponden a los porcentajes publicados por diferentes autores para el área tropical (de Armas y Solano, 1996; Ambrose y col., 1999). (Cuadro 2).

En el caso de la transferencia de embriones congelados, la diferen-

cia entre épocas (I: 45% vs II:21.4%) resultó estadísticamente diferente ($P<0.05$). Estos resultados han sido descritos anteriormente tanto para la IA, transferencia en fresco o de embriones congelados y han sido relacionados con el estrés calórico (Ambrose y col., 1999). A pesar de esto, en la región de Azuero no hubo grandes diferencias entre ambas épocas, en las variaciones de temperaturas promedio entre épocas (I:27.5 vs II:26.7°C), mientras que fueron más acentuadas las diferencias en cuanto a la biotemperatura \bar{X} , de 24.5°C en la época I vs 26.2°C en la época II y esto parece estar relacionado con la gran diferencia en cuanto a los niveles de precipitaciones promedios existentes entre épocas (I:55 mm vs II:193 mm), lo cual produce que las magnitudes de evaporación y humedad relativa sean extremadamente altas en la época II, provocando un recalentamiento de la economía del animal e ineficiente pérdida de calor en el mismo. Si unimos a esto, que la incidencia de lluvias es alta y se corresponde fundamentalmente a horas de la tarde y la

CUADRO 2. RESULTADOS DE PREÑEZ ALCANZADOS CON EMBRIONES CONGELADOS Y FRESCOS TRANSFERIDOS EN DOS ÉPOCAS DE AÑO.

| Tipo de Embrión | Número de embriones | Enero – Mayo (I) | | Junio-Diciembre (II) | |
|-----------------|---------------------|------------------|------------|----------------------|------------|
| | | No. | % (preñez) | No. | % (preñez) |
| Frescos | 25 | 13 | 61.54 a | 12 | 58.33 a |
| Congelados | 48 | 20 | 45.00 b | 28 | 21.43 c |
| Totales | 73 | 33 | 51.52 d | 40 | 32.50 e |

Letras diferentes en una misma fila difieren significativamente $P < 0.05$.

noche, los animales están sometidos a un fenómeno de altas temperaturas y humedad durante el día, mientras que en la noche se enfrentan a un enfriamiento corporal, por efecto de la propia lluvia, creándose un estrés, que puede ser correlacionado con los bajos resultados logrados en la época II. Resultados similares han sido observados en estudios realizados en Florida en programas de IA por Thatcher y col. (1990) y Yaser y col. (1999).

Para tratar de explicar el por qué son más marcadas las diferen-

cias en los índices de preñez en los embriones congelados, nos apoyaríamos en que éstos de por sí mismos logran menores índices que con los embriones frescos (31.2 vs 60.0%), debido a la pérdida de células durante la congelación, como fue descrito por Mazur (1977), lo que sin dudas los hace más vulnerables a cambios en el medio uterino receptor y, por ende, sus posibilidades de sobrevivida son menores.

Lo anteriormente planteado también sugiere que los resultados alcanzados en referencia a la sincronización receptora donante (ver

Cuadro 3), a pesar de que no se pudo establecer diferencias estadísticas, la tendencia observada puede estar relacionada con los embriones congelados. Estos alcanzan los mayores índices de sobrevivencia en úteros más tempranos en la fase luteal (+1 día), los cuales brindan condiciones uterinas más favorables a su desarrollo (+1: 45% vs 0: 21.4%), lo que puede no ser tan importante para los embriones transferidos en fresco. No obstante la literatura consultada plantea que los mejores índices de gestación se obtienen al realizar las transferencias con una sincronización de 12 horas entre receptoras y donante (Leter y col. 1999).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados de la transferencia de embriones congelados, se concluye que existen diferencias entre los índices de preñez logrados en las dos épocas de año estudiadas y que para lograr los más altos resultados con este tipo de embriones se recomienda realizar los mismos durante los meses de enero a mayo. Se recomienda continuar el estudio de la influencia de la sincronización embrión receptora en un tamaño muestral mayor.

CUADRO 3. ÍNDICES DE PREÑEZ LOGRADOS POR EMBRIONES FRESCOS Y CONGELADOS CON RELACIÓN A LA SINCRONIZACIÓN RECEPTORA DONANTE.

| Tipo de embrión | Sincronización receptora donante | | | | | |
|-----------------|----------------------------------|------------|----|-------------|------------|------|
| | + 1 día | | | 0 | | |
| | Transf. (+) | % (preñez) | | Transf. (+) | % (preñez) | |
| Frescos | 8 | 6 | 75 | 13 | 9 | 69.2 |
| Congelados | 15 | 6 | 40 | 33 | 9 | 27.3 |

BIBLIOGRAFÍA

- AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; THATCHER, M.J.; BINELLI, M.; HANSEN, P.J.; CHENOWETH, P.J.; THATCHER, W.W. 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cows. *J. Dairy Science* 82: 2369 - 2376.
- DE ARMAS, R.; SOLANO, R. 1966. Manual práctico de transferencia de embriones y fertilización *in vitro*. Ed: CIMA, La Habana.
- DONALDSON, L. 1984. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology* 21: 1013-1018.
- KAWAMATA, M. 1999. Superovulation of Holstein cow with follicular cyst. *Theriogenology* 51: 408 Abst.
- MAPLETOFT, R.; BO, G.A.; DEL CAMPO, M.R. 1993. Factores que afectan la superovulación en la vaca. Consideraciones prácticas. *En Proc. Simposio Internacional de Reproducción Animal*. 22-24 Octubre. Córdoba, Argentina. p. 87.
- MAZUR, P. (s/a). Slow freezing in mammalian cells. *En The freezing of mammalian embryos*. Elsevier, Excerpta, Amsterdam. pp 19-48.
- NIEMANN, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock. Current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124.
- PALMA, G. A.; BREM, G. 1993. Transferencia de Embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 1993.
- PRICE, C.A.; CARRIERE, P.D.; GOSELIN, N.; KOHRAM, H.;

- GUIBAULT, L.A. 1999. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle and consequences for embryo production. *Theriogenology* 51: 409.
- SOLANO, R.; DE ARMAS, R.; BERNAL, A.; PEDROSO, R. 1992. Efecto de dos sistemas de explotación destinados a la transferencia de embriones. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* 15: 103-110.
- THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J.; PLANTE, C.; BADINGAN, R.; VAN CLEFF, J.; DANET, G.; DESMOYER, J.D.; SAVIO, J.D. 1990. Understanding and exploiting the physiology and endocrinology of reproduction to enhance reproductive efficiency in cattle. *Proc. New Zeland Society Anim. Prod.* 50:109-121.
- TOSI, J.A. 1971. Inventariación y demostraciones forestales: Panamá Zonas de Vida. Ed: UNDP-FAO. Roma.
- YASER, M.; A1-KALANI.; WEBB, B.W.; HANSEN, P.J. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90 day non return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J. Dairy Science* 82: 2611-2615.