

INDICE

BIOTECNOLOGÍA EN LA GANADERÍA

BT 3 AVANCES EN EL ESTUDIOS DEL GEN MSP5 DE ANAPLASMA MARGINALE PARA SER UTILIZADO EN EL DIAGNÓSTICO

BT 4 OBTENCIÓN DE POBLACIONES TOTALMENTE HEMBRAS DE TRUCHA ARCOIRIS (ONCORHYNCHUS MYKISS) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE REVERSIÓN SEXUAL

BT 5 PRODUCCIÓN Y TRANSPLANTE DE EMBRIONES BOVINOS DE LA RAZA CRIOLLO LIMONERO

BT 6 REPRODUCTIVE RESPONSE OF CROSSBRED HEIFERS (GDP) USED AS EMBRYO RECIPIENTS IN VENEZUELA.

BT 7 UTILIZACIÓN DE UN ESQUEMA ACTUALIZADO DE SUPEROVULACIÓN, RECOLECCIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DE CABRAS EN MÉXICO

BT 3 AVANCES EN EL ESTUDIOS DEL GEN *MSP5* DE *ANAPLASMA MARGINALE* PARA SER UTILIZADO EN EL DIAGNÓSTICO

Corona, Belkis ; Finalet, j. Blandino, ; Teresita y Martínez, Siomara.

Biología Molecular, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, Apdo 10, San José de las Lajas, La Habana. Cuba

RESUMEN

Se realizó la amplificación del gen *msp5* de *Anaplasma marginale* en diferentes aislamientos cubanos del hemoparásito, amplificando una banda de 652 pb, así como el clonaje en pGEX-3X, secuenciación y expresión de dicho gen en el aislamiento Habana, mostrando un 98.1% de homología de la secuencia del gen descrita para el aislamiento de referencia Florida. La proteína MSP5 expresada fue reconocida por 8 sueros de animales de campo.

INTRODUCCIÓN

Anaplasma marginale es una rickettsia del genogrupo II de las Ehrlichias, que parasita únicamente los eritrocitos maduros del ganado bovino y causa severas pérdidas económicas fundamentalmente en las zonas tropicales y subtropicales (Palmer y col., 1999). Se han caracterizado seis proteínas de superficie de membrana de los cuerpos iniciales de este organismo, portadoras de epitopos B y T, denominadas proteínas mayoritarias de superficie (MSPs) y designadas 1a, 1b, 2, 3, 4 y 5.

A pesar de las cuantiosas pérdidas producidas todos los años, hasta el momento no se cuenta con un método de control eficaz contra la enfermedad. A esto se le agrega la necesidad de contar con técnicas de diagnóstico más sensibles que permitan la detección de animales portadores para ser utilizadas en el movimiento de ganado hacia zonas libres de la enfermedad, así como para conocer la prevalencia de la enfermedad en las regiones tropicales y subtropicales (Camacho y col., 2000).

El gen *msp5* está representado en el genoma como una simple copia, altamente conservado entre todas especie de *Anaplasma* y todas las cepas de *A. marginale*. Por su parte la proteína MSP5, para la cual codifica, es de poca complejidad estructural e igualmente conservada y la proteína nativa y la recombinante muestran un epitopo conservado reconocido por el monoclonal ANAF16C1. Todo lo anterior simplifica el uso de dicho gen y de la proteína en el desarrollo de procedimientos de diagnóstico de la entidad (Visser y col., 1992). El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la presencia del gen *msp5* de *A. marginale* en aislamientos de diferentes regiones geográficas de Cuba, así como el clonaje y secuenciación del gen *msp5* del aislamiento Habana, la expresión de la proteína recombinante H-MSP5 y el reconocimiento de la misma por sueros de animales de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de ADN: La purificación del ADN de *A. marginale* se realizó a partir de sangre parasitada con los distintos aislamientos (Habana, Valle del Perú, Oriente 1, Oriente 2), según la metodología descrita por Ambrosio y Potgieter, 1987). El ADN de *B. bovis* y *B. bigemina* se purificó según el protocolo descrito por Fahrimal y col., 1992. El ADN de los aislamientos Florida y Idaho fue gentilmente cedido por el Dr. Guy H. Palmer (Departamento de Medicina Veterinaria y Parasitología, Washington State University y el ADN de *Trypanosoma* sp por la Dra. María de Lourdes Muñoz (Laboratorio de Genética, CINVESTAV, México).

Amplificación del gen *msp5*: Se diseñaron dos cebadores complementarios a la región inicial y terminal del gen que codifica para la proteína MSP5 del aislamiento Florida, a partir de la secuencia reportada en la literatura (Visser y col., 1992), cuya secuencia fue GTGTTTCGTTGGGGTGTGATAGATGAG (96-122) y TAAGAATTAAGCATGTGACCGCTGAC (722-748).

Se realizó la amplificación del gen de interés utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen final de 25 µL. Los resultados se aplicaron en geles de agarosa al 0.8% en TBE (0.5X), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta LKB, Pharmacia.

Clonaje, del gen *msp5* del aislamiento Habana de *A. marginale*: Se utilizaron los mismos cebadores empleados en el experimento anterior, y el mismo programa de amplificación. El vector de expresión pGEX-3X (Pharmacia), se digirió con la enzima de restricción *Sma* I y se desfosforiló con fosfatasa alcalina. El producto amplificado se trató con Klenow y T4 PNK. Posteriormente se realizó la purificación de ambas preparaciones y se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa, según las indicaciones de la casa productora. La transformación se realizó en células competentes de *E. coli* DH 5 α . Se realizó la purificación de los plásmidos posibles recombinantes, contentivos en las colonias, por el método de minialcalino. Para su análisis se utilizó la enzima *Bam*HI y para analizar el sentido de orientación del fragmento clonado se empleó *Eco*R I.

Secuenciación: La reacción se realizó utilizando un secuenciador automático ALFexpress II. El análisis de los resultados de la secuenciación se realizó mediante el programa PC/Gene (Francisco Sobrino, 1991).

Expresión: La expresión de un clon recombinante (pHMSP5) y del vector vacío (pGEX-3X) se indujo con IPTG (1mM), cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O) de 0.4, a una longitud de onda (λ) de 530 nm. Los resultados de la inducción se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12%-SDS. La detección inmunológica se realizó mediante Western Blot, utilizando un policlonal monoespecífico y el monoclonal ANAF16C1.

Evaluación de la proteína H-MSP5 del aislamiento Habana de *A. marginale* con diferentes sueros de campo: Se prepararon tiras de nitrocelulosa con el clon expresando la proteína H-MSP5, mediante inmunotransferencia de una electroforesis de poliacrilamida al 12 %-SDS.

Para la obtención de los sueros se tomaron 10 mL de sangre de animales de campo de diferentes regiones geográficas de Cuba donde existe la enfermedad (Pinar del Río, La Habana, Oriente). Se utilizaron 2 sueros de campo negativos a *A. marginale*, 8 sueros de campo positivos, procedentes de diferentes regiones geográficas del país y un suero positivo a *B. bovis*, trabajados a una dilución 1/20 en PBS. Utilizando la técnica de aglutinación rápida en tarjeta, se determinó cuales de estos sueros eran positivos y cuales negativos a *A. marginale*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la amplificación del gen *msp5* de *A. marginale* de aislamientos cubanos de diferentes regiones geográficas de Cuba, obteniéndose la amplificación de una banda de 652 pb con los cebadores específicos para el gen que codifica para la proteína MSP5, lo que demuestra la presencia de dicho gen en los aislamientos de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas del país (Fig. 1), coincidiendo con la talla reportada en la literatura por Visser y col., 1992, que describen el gen *msp5* como un gen de simple copia de 633 pb. Este gen codifica para la proteína MSP5, conservada en todas las especies estudiadas de Anaplasma: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* y en todos los aislamientos de *A. marginale* examinados, en los estadios del eritrocito, así como en todos los estadios de *A. marginale* estudiados, incluyendo el cultivo del organismo (Barbet y col., 1999).

1 2 3 4 5 6 7 8 9

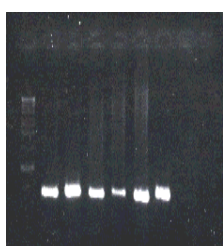


Fig. 1: Amplificación del gen *msp5* en diferentes aislamientos de *Anaplasma marginale*. Línea 1: Marcador de peso molecular 1 kb; 2: Habana; 3: Valle del Perú; 4: Oriente 1; 5: Oriente 2; 6: Florida; 7: Idaho; 8: control negativo; 9: control de H₂O.

1 2 3 4 5 6 7 8

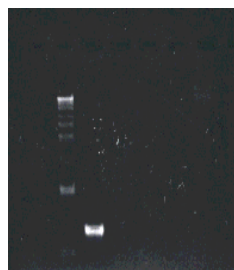


Fig. 2: Amplificación del gen *msp5*. Línea 1: Marcador de peso molecular 1 kb; 2: ADN de *Anaplasma marginale*; 3: *B. bovis*; 4: *B. bigemina*; 5: *Tripanosoma* sp; 6: ADN bovino; 7: Control negativo; 8: Control de H₂O.

En la figura 2 se puede apreciar la alta conservación de este gen para *Anaplasma*, ya que no hubo amplificación cuando se utilizó ADN de otros hemoparásitos, ni con ADN bovino.

De las colonias obtenidas de la transformación se analizaron las recombinantes por digestión con *BamH* I. Posteriormente se determinó por digestión con *EcoR* I los clones que tenían el sentido correcto de orientación, eligiendo un clon recombinante denominado pHMSP5.(datos no mostrados)

La secuenciación del gen *msp5* del aislamiento Habana clonado permitió conocer, que la secuencia del inserto tiene un 98.1% de homología con la descrita para el aislamiento Florida (Visser y cols., 1992), lo que nos habla a favor del sistema de amplificación usado y corrobora la alta conservación de la secuencia del gen *msp5* de los distintos aislamientos de *A. marginale* (Echaide y col., 1998).

Las diferencias encontradas están dadas por cambios puntuales de bases que no provocan cambios en la secuencia de aminoácidos, pues según el programa de análisis utilizado, nuestra proteína y la del aislamiento Florida coinciden en un 99.5%.

Se estudió la expresión de la proteína H-MSP5, en *E. coli*, a partir del clon recombinante pHMSP5, (Fig. 3), apareciendo dos bandas de una talla aparente de 23 kDa y 21 kDa en el patrón de proteínas de dicho clon inducido con IPTG, y con menor intensidad en el clon sin inducir, y no aparecen en el plásmido sin inserto inducido y sin inducir. Esta banda de menor tamaño puede ser producto de la degradación proteolítica por proteasas celulares, pues se sabe que *E. coli* como cepa hospedera tiene una serie de desventajas ya que produce proteasas que pueden destruir las proteínas recombinantes obtenidas (Zabriskie y Arcuri, 1986). Saito y col., 1993, encontraron resultados similares al expresar en *E. coli* la proteína de 29 kDa de *Mycoplasma gallisepticum*, atribuyendo la presencia de dos bandas reconocidas por el antisuero, a la acción de proteasas de *E. coli*.

Los resultados del Western Blot utilizando el antisuero policlonal monoespecífico X-MSP5 (datos no mostrados) y el AcMc ANAF16C1 (Fig 4) mostraron que ambos son capaces de detectar las dos bandas de proteínas, lo que indica similitud antigénica entre las bandas de 21 y 23 kDa.

Podemos observar que la proteína H-MSP5 obtenida, no está fusionada a la Glutación-S-Transferasa (GTS) del pGEX-3X, como debía ocurrir, según la estrategia de clonaje utilizada, pero uno de nuestros cebadores empleado para la amplificación del gen (GTGTTTCGTTGGGGTGT GATAGATGAG) tiene en su secuencia el sitio de unión al ribosoma del gen *msp5*, lo que hace que la proteína se exprese pero no fusionada a la GTS del plásmido.

El peso molecular de la proteína H-MSP5, estimado por densitometría fue de 23 kDa, resultando superior al del aislamiento Florida (19 kDa) (Visser y cols., 1992). Esta diferencia de talla pudiera deberse a características del aislamiento en estudio, a pesar de que estos autores plantean que el gen *msp5* se expresa como un polipéptido de aproximadamente 19 kDa en la membrana de todas las cepas de *A. marginale* examinadas.

El hecho de que el monoclonal reconozca nuestra proteína, corrobora los resultados obtenidos por otros autores, que plantean que el epitopo, definido por la unión a este AcMc, además de estar conservado en *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* induce altos títulos de anticuerpos en todas las especies infectadas que incluye ganado, ovejas y carneros.

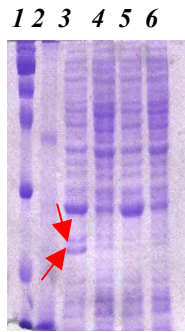


Fig. 3: Resultado de la expresión del clon recombinante pHMSP5 en poliacrilamida 12%-SDS. Línea 1: Marcador de peso molecular (6.5-200kDa); 2: cuerpos iniciales de *A. marginale*; 3: pHMSP5 inducido; 4: pHMSP5 sin inducir; 5: pGEX-3X inducido; 6: pGEX-3X sin inducir.



Fig.4: Resultados del Western Blot con el AcMc ANAF16C1. Línea 1: pHMSP5 inducido; 2: pHMSP5 sin inducir; 3: pGEX-3X inducido; 4: pGEX-3X sin inducir.

La proteína MSP5 fue reconocida por 8 sueros de campo, utilizados en este estudio, identificados previamente como positivos a *A. marginale* por el ensayo de Aglutinación en Tarjeta. No se evidenció reacción con los sueros negativos, ni con el suero de un animal infectado con *B. bovis*. El reconocimiento de esta proteína por los sueros de animales de campo resulta de gran valor para la evaluación de esta en un futuro juego diagnóstico, con vistas al diagnóstico de campo rápido y altamente sensible y específico que permita el estudio de animales portadores asintomáticos de la enfermedad y que apoye los programas de vacunación contra la misma.

Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo sientan las bases de la posible obtención de un sistema de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad para *A. marginale*, ya que el hecho de contar con un antígeno recombinante de alta conservación y homología, así como que se reconoce por sueros de animales de campo, no solo posibilita la producción de un antígeno a un menor costo, sino que también permitirá el desarrollo de sistemas inmunoenzimáticos de formato simple de alta sensibilidad y especificidad para la detección de portadores asintomáticos de la enfermedad, lo cual está siendo utilizado con mucha fuerza en el movimiento de ganado a nivel internacional. A su vez en Cuba esto significa un soporte diagnóstico para este hemoparásito, que acompañe a los programas de vacunación contra la garrapata que se ejecutan a partir de la obtención de la vacuna GAVAC (Heber Biotech) contra *Boophilus microplus*, en diferentes regiones de América Latina donde se comercializa la vacuna y la anaplasmosis constituye un problema de salud en el ganado bovino. A partir de estos resultados quedan abiertos nuevos caminos para la obtención de estos sistemas económicos, altamente sensibles y específicos en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ambrosio, R. E. y Potgieter, F. T. (1987). The genome of *Anaplasma*: DNA composition and DNA/DNA hybridization. *J. Vet. Res.* 54: 53-65.
2. Camacho, M.; Muñoz, M. L.; Suarez, C. E.; McGuire, T. C.; Bronw, W. C. y Palmer, G. H. (2000). Expression of polymorphic *msp1β* genes during acute *Anaplasma marginale* rickettsemia. *Infect. Immun.* 68: 1946-1952.
3. Echaide, S. T.; Knowles, D. P.; McGuire, T. C.; Palmer, G. H.; Suarez, C. E. y McElwain, T. F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in an endemic region using nested PCR and recombinant MSP5-cELISA. *Clin. Microbiol.* 36: 777-782.
4. Fahrimal, Y.; Goff, W. L.; Jasmer, D. P. (1992). Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1374-1379.
5. Munodzana, D.; McElwain, T. F.; Knowles, D.P. y Palmer, G. H. (1998). Conformational dependence of *Anaplasma marginale* MSP5 surface exposed B cell epitopes. *Infect. Immun.* 66: 2619-2624.
6. Palmer G. H.; Rurangirwa, F. R.; Kocan, K. M. y Brown, W.C. (1999). Molecular basis for vaccine development against ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today* . 7:281-286.

7. Saito, S.; Fijisawa, A.; Ohkawa, S.; Nishimura, N.; Abe, T.; Kodama, K.; Kamogawa, K.; Aoyama, S.; Iritani, Y. Y Hayashi, Y (1993). Cloning and DNA sequence of a 29 kDa polipeptide gene of *Mycoplasma gallisepticum* as a possible protective antigen. *Vaccine*. 11: 1061-1066.
8. Sobrino, F. (1991). PC/Gene: The nucleic acid and protein sequence analysis software system.
9. Visser, E. S.; McGuire, . C.; Palmer, G. H.; Davis, W. C.; Shkap, V.; Pipano, E. y Knowles, D. P. JR. (1992). The *Anaplasma marginale msp5* genes encoded 19 kDa protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60: 5139-5144.
10. Zabriskie, D. W. y Arcuri, E. J. (1986). Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganism. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 706

BT 6 REPRODUCTIVE RESPONSE OF CROSSBRED HEIFERS (GDP) USED AS EMBRYO RECIPIENTS IN VENEZUELA.

Roa, Noris¹⁾, Linares, T.¹⁾, Tamasauskas, Rita²⁾ and Escobar, Maria D.¹⁾

¹⁾ Instituto de Investigaciones Zootecnicas, CENIAP INIA, Ave. Universidad, Apdo. Postal 4653, Maracay 2101, Aragua, Venezuela. Telefax: 58-243-2466604; 2342385. E-mail: njroa@reacciun.ve,

²⁾ Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos. LABIPRESAN. San Juan de Los Morros, Guárico. Telefax 58-243-2320729. Venezuela.

ABSTRACT.

Plasma Progesterone (P4) concentrations were determined by Enzyme-Linked Immuno absorbent Assay (ELISA) in 47 crossbred recipients (GDP) in a commercial embryo transfer (ET) program in the savannas of Venezuela. This study was carried out to evaluate the reproductive response of these embryo recipient heifers. Pregnancy status was confirmed by rectal palpation 60 days after estrus. Pregnancy rates were 38.3% (18/47) while a 61.7% stayed open. There were no significant differences between plasma P4 concentration of females that remained pregnant and those that did not either on day 0 (estrus) or 7 (ET). On day 21, the mean concentrations of P4 in pregnant females was 12.2 ng/ml being significantly higher compared to non-pregnant females (0.82 ng/ml). Recipients having plasma P4 concentrations of 2 ng/ml or more on day 21 were considered pregnant. This type of early pregnancy diagnosis using as a discrimination criterion 2 ng/ml of P4 in plasma, had an efficiency of 75% in detecting pregnant recipients and 100% in detecting open heifers correctly, for day 21 post estrus. It was concluded that this type of heifers has a good reproductive response as recipients of embryos in the Venezuelan tropics. Evaluating the concentrations of P4 on day 21 after estrus gave a high percentage of certainty in the early diagnosis of pregnancy. This would allow us to reuse the open recipient for ET before 60 days post estrus, and reduce the cost for maintenance.

Keywords: progesterone, embryo, recipients, ELISA.

Cattle-raising in Venezuela is based mostly on the crossbreeding of several non direct breeds between the native races *Bos indicus* (zebu) and *Bos taurus* coming from specialised dairy farms. This racial type of cattle has the potential of being used as embryo recipient to accelerate the descendency rate of those animals with a better genetic value. This would encourage group elite bovine growth, which would help in shortening the time needed to develop a tropical cattle-raising model [1]. Since in the tropics, the endocrine control of the reproduction of embryo recipients has not been well investigated, it is important to study the hormonal profiles involved in the reproduction of the above mentioned racial types to compare them to those reported for cattle under temperate conditions [1,3,4].

Although embryo transfer (ET) have been used on several farms as techniques to accelerate animal production, low pregnancy rates of the recipients has been the cause of some economic losses in Venezuela. Therefore, there is a need for improving the reproductive efficiency of these recipients. This study was designed to evaluate the reproductive response with plasma progesterone concentrations, using the ELISA technique, of these embryo recipient heifers.

MATERIALS AND METHODS.

The present investigation was carried out on a cattle farm located in Monagas, Venezuela. The farm is in a savanna area with good water drainage, seasonal plains, high temperatures with rainfall average of 1350 mm and annual average temperature of 26.4 °C, seven month dry period (November to May) and five month rainy period (June to October). The quantity and quality of forage offer is associated with the rain cycle, temperature and wind changes. The study included a total of forty-seven 2 to 2 ½ year-old heifers of crossbred *Bos indicus* x *Bos taurus* as recipients of bovine embryos. Those heifers with *Bos indicus* or *Bos taurus* predominance had > 62,5% of the respective characteristics. These animals were scoring 5 to 6 on body condition score according to the 1-9 scale for beef cattle [5] and checked for regular estrous cycles (EC).

Eight ml of blood from the coccygeal blood vessels was collected on the day of estrus (day 0), embryo transfer day (day 7) and days 21, 28, 35, 42 and 49 post estrus from each one of the 47 recipients. The blood was placed in

vacutainer tubes with potasic EDTA. Tubes were immediately centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm to avoid metabolisation [6,7], transferred the plasma obtained to plastic vials and identified for freezing at -20 °C until processing in the laboratory by the ELISA technique [1]. All the factors that could influence sampling were standardised, i.e., sampling at the same hour in the morning (6:30 AM) maintaining the same standard compilation, centrifugation, freezing and storage. The non-surgical embryo transfer technique was used [1,8]. The recipient's estrus was recorded after the ET and the confirmation of pregnancy was accomplished by rectal palpation 60 days post estrus. Data were analysed by correlation to determine the degree association between P4 concentrations and the different sampling days. The linear regression analysis was used to verify the prediction degree of the values to 7 day of the EC with the P4 concentrations of the different sampling days.

The variance analysis was used to determine the significant differences of P4 concentrations between the group of pregnant and open recipients on the different sampling days and the Tukey mean comparison test [10]. The P4 concentration in plasma over 2 ng/ml was used as a criteria to diagnosis early pregnancy 21 days post estrus [1], the greater values to 2 ng/ml in plasma was considered pregnant and the lower or equal values open. The percentage analysis of P4 vs pregnant or open recipients was used to determine certainty in this early pregnancy diagnosis. The CV intrassay yielded 5,77 % and the CV interassay yielded 6,50 %, these values are within the optimum ranges of CV for both tests-

RESULTS.

Of a total of 47 recipients, 18 of them (38.3%) resulted pregnant and 29 recipients (61.7%) resulted open. The mean plasma P4 concentrations on each sampling day are shown in Table 1. The linear regression equation for pregnant females was $\bar{Y} = 4.1522 + 0.1840 x$, and for open females it was $\bar{Y} = 3.5657 + 0.0417 x$. The evaluation accomplished by the use of a Kit indicated that there was parallelism [2,9]. The percentage analysis of P4 vs pregnant or open recipients number to determine in the early pregnancy diagnosis 21 days post estrus had an certainty of 75% in detecting pregnant and 100% in detecting open heifers correctly, using 2 ng/ml of P4 in plasma as a discrimination criterion [1]. Of 24 recipients diagnosed pregnant for having values > 2 ng/ml on 21 day post estrus, 25% (6) of them were diagnosed open by rectal palpation 60 days post estrus.

Table 1. Plasma progesterone concentrations in crossbreed bovine embryos recipients.

Sampling Day	0 (estrus)	7 (ET)	21	28	35	42	49
Pregnant * n=18	0.85 _{ns} (± 0.52)	5.75 _{ns} (± 1.82)	12.16 _a (± 2.18)	11.08 _a (± 3.27)	11.48 _a (± 3.40)	9.47 _a (± 4.84)	11.70 _i (± 3.54)
Open* n=29	1.40 _{ns} (± 1.93)	6.20 _{ns} (± 3.26)	0.82 _b (± 0.42)	6.70 _b (± 4.02)	7.89 _b (± 4.51)	2.96 _b (± 4.28)	5.00 _i (± 3.37)

ET= Embryo Transfer.

* = ng/ml. a, b = different letters mean significant (p < 0.05).

DISCUSSION.

On the blood sampling day the P4 concentration showed a quantitative variation in the basic stage of the estrous cycle and in the physiological state (open or pregnant). As a rule of thumb, the cyclical standard of the P4 concentrations found in this trial agrees with the changes that occur during the estrous cycle due to the functioning corpus luteum (CL), not only for pregnant recipients but also for open ones. Also, the results of the present and other studies can account for the luteal function by P4 concentration at the peripheral level [1,3,11,12]. The variance analysis served to compare differences between P4 concentrations on the different sampling days and between the groups of recipients (pregnant, open). It did not demonstrate significant differences between the two groups for day 0 (estrus) and day 7 (ET) of the estrous cycle. Therefore, P4 concentrations on day 0 (estrus) and day 7 (ET) of the estrous cycle did not represent a sure indication by itself for recipient selection during these days. So it did help to

not discard potential embryo recipients that had adequate P4 concentrations and whose rectal palpation possessed small CL (*Bos indicus*) and were thus eliminated as embryo transfer recipients.

The early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients was observed from day 21 post estrus. There were significant differences ($P < 0.05$) between the P4 concentrations of the two groups of recipients. In pregnant recipients, the mean P4 concentration was maintained at high levels, in comparison to the open ones whose values decreased until triggered a new estrous cycle. This difference between pregnant and open heifers was maintained during the rest of the sampling days (days 21, 28, 35, 42 and 49). This early pregnancy diagnosis by P4 concentration had an certainty of 75% in detecting pregnant recipients and 100% in detecting the open ones 21 day post estrus, using as a discrimination criterion 2 ng/ml of P4 in plasma [1], where the greater values to 2 ng/ml was considered pregnant and the lower value or equal were considered open.

Of 24 recipients diagnosed pregnant for having values $>$ of 2 ng/ml 21 day post estrus, 20% (6) of them were diagnosed open by rectal palpation 60 days post estrus. These recipients probably presented abnormal estrous cycle, due to pregnancies that they did not reach at 60 days, and/or to the presence of some uterine dysfunction resulting from microorganic contamination at the time of the ET, although the cause were not well established in the present study. However the recipients diagnosed open 21 day post estrus, could be used once again (rapid recycle) as recipients, without having to wait the diagnostic confirmation by rectal palpation at 60 days post estrus. This could represent a saving in maintenance costs of them. In conclusion, the crossbred heifers had a good reproductive response as recipients of embryos in the sannvanas of the Venezuelan tropics. The determination of P4 plasma recipient's evaluated pregnant cows and the open ones were similar in those reported *Bos taurus* literature, these recipients however, being able to adapt to tropical conditions. This response enables them to achieve a good reproductive performance as embryo recipients. The determination of P4 concentrations on day 21 post estrus resulted in a high percentage of safety in an early diagnosis of open females. This allowed us to reuse them before 60 days post estrus thereby reducing their maintenance costs.

REFERENCES

1. **Roa N, Linares T, Barrios D, Ramirez de Rolo M and Tamasaukas R.** Determinación de progesterona plasmática por el método de ELISA en receptoras de embriones bovinos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*. 1997; 7:133-138.
2. **Cekan S. K.** New methods of steroid analysis: on the assessment of validity of steroid radioimmunoassays. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1979; 11:135-141.
3. **Díaz T, Manzo M, Trocóniz J, Benacchio N and Verde O.** Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein and Brahman cows, Carora type and crossbred heifers. *Theriogenology*. 1986; 26: 419-432.
4. **Chagas e Silva JN, Cidadao MR e Costa JA.** Selecao de vacas frísias para receptoras de embriões frescos e congelados com base na progesterona plasmática. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias*. 1993; 88: 508: 156-163.
5. **Herd DB and Sprott LR.** Body condition, nutrition and reproduction of beef cows. *Texas Agric. Ext. Ser. Bull*. 1986; B-1526.
6. **Vahdat F, Hurtgen JP, Whitmore HL, Johnston SD and Ketelsen CL.** Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. *Theriogenology*. 1979;12: 371-374.
7. **Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G and Posadas E.** Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* . 1991; 35:965-975.
8. **Shea BF.** Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology* .1981;15: 31-35.
9. **Silvan G, Illera JC, Illera MJ, Illera M.** Development and validation of competitive ELISA to measure steroid follicular fluid levels in heifers. *Theriogenology*. 1992; 37: 298 (Abstract).
10. **Steel RGD y Torrie JH.** Bioestadística: Principios y procedimientos. McGraw Hill. Ed. México. 2ª Edición. 1988; 1-622.
11. **Hasler JF, Bowen RA, Nelson LD and Seidel GE** Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *J. Reprod. Fertil.* 1980; 58: 71-77.
12. **Hussein FM, Paccamonti DL, Eilts BE and Younis MY.** Comparison of ovarian palpation, milk progesterone and plasma progesterone in the cow. *Theriogenology*. 1992; 38: 431- 439

BT 5 PRODUCCIÓN Y TRANSPLANTE DE EMBRIONES BOVINOS DE LA RAZA CRIOLLO LIMONERO

S. Zambrano¹, R. González^{2,3}, J.C. Velarde³, G. Contreras¹, M. Pirela¹ P. Este⁴.

Fax: 0262 – 940184

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). ² Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (LUZ). ³ Venezolana de Inseminación Artificial y Transplante de Embriones, C.A. (VIATECA). ⁴ Corporación de Desarrollo de la Región Zuliana (CORPOZULIA).

ABSTRACT

Production and transfer of bovine embryos from criollo limonero breed

An official program (CORFONLUZ) of multiovation and embryo transfer (MOET). It'll be conducting with the objective of increasing and make better the venezuelan criollo limonero cattle, which by reducing population is going to despair. This Venezuelan breed is original from Hispanic bovine, brought to America during the colonial times, got it characteristic for it's great adaptation to the extreme warm tropical conditions, high fertility and milk production. The main objectives of this work is to know the production results and fertility embryo post transfer of breed criollo limonero. Hare been recollected 555 eggs which 59.5% were transferable embryos, this rate of embryos recollected by cow washed of 5.2 ± 5.9 E.T, 2.59 ± 3.8 untransferable embryos (E.N.T) and 1.0 ± 2.59 ovule not fecund (O.N.F). The high reproduction efficiency of this breed it's evident, to obtain a fertility index of recollected egg from 88.9% and 43.8% a pregnancy rate.

Palabras claves: Embriones congelados, Transplantes de embriones, Bovinos, Criollo Limonero.

Key words: Frozen embryos, embryos transfer, bovines. Criollo Limonero.

INTRODUCCIÓN

El Ganado Criollo Limonero es una raza venezolana originaria de bovinos hispanos traídos a la América durante la colonia, ha demostrado ser una raza de alta resistencia a las condiciones climáticas del bosque seco trópico. Su excelente eficiencia reproductiva, docilidad, capacidad pastoreadora, resistencia a enfermedades y satisfactoria producción de leche en los diversos sistemas de explotación bovina en el trópico, hacen de esta raza un excelente genoma de conservación para servir como base genética en el fomento de rebaños lecheros y doble propósito en nuestro medio.

La drástica reducción de la población del Criollo Limonero, considerado patrimonio nacional, obliga al estado venezolano a implementar políticas inmediatas para incrementar su población. La producción y transplantes de embriones de esta raza permite de manera efectiva, aprovechar el máximo potencial genético y reproductivo de los mejores vientres, acelerando su descendencia. La aplicación de esta técnica, conjuntamente con el empleo de semen de toros sobresalientes, reduce significativamente el número de generaciones en el proceso de mejoramiento genético.

El objetivo de este trabajo es el de consolidar un programa de múltiple ovulación y transplante de embriones (MOET), destinado a fomentar y mejorar el ganado Criollo Limonero a través del Convenio Interinstitucional CORFONLUZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizaron 31 vacas multíparas Criollo Limonero Elites (más de 2000 kg. de leche por lactancia). Estas fueron superovuladas mediante un régimen decreciente de 2.5, 2.0, 1.0, 1.0 mL x 2 de Folltropin (Vetrepharm, Canadá), durante 4 días. El tercer día del tratamiento fueron aplicados 22.5 mg de Luprostiol (Prosolvlin, Intervet, Holanda) para inducir celo. Los animales servidos a las 0, 12, 24 horas después de detectado el celo, utilizando pajuelas de semen de toros Criollo Limonero. Luego de una semana de haber sido inseminadas estas donadoras fueron recolectadas utilizando 1000 mL de solución Phosfato-buffer-salino modificado (PBSM), suplementado con 0.04% de suero albúmina bovina (BSA). Fracción V, antibióticos y antimicóticos. Los huevos

recolectados fueron clasificados en: embriones transferibles (ET), embriones no transferibles (ENT) y óvulos no fecundados (ONF) (Linder y Wright, 1983)

Durante la congelación de los embriones se empleó una solución de 1.5 M de Etilenglicol, 0.4% BSA y 0.1 M Sucrosa (Voelkel y Xu, 1995). Los embriones fueron expuestos en Etilenglicol durante 10 minutos y envasados en pajuelas de 0.25 ml. Los embriones fueron colocados en la cámara de congelación a -6 °C durante 10 minutos. La cristalización fue inducida a los 2 minutos seguido de una segunda fase de enfriamiento hasta -32 °C (0.5 °C/min) y al final fueron sumergidos en nitrógeno líquido. La descongelación de los embriones fue realizada exponiendo las pajuelas a la intemperie durante 10 seg. Y luego sumergidos durante 10 seg. En agua a 37 °C. Las pajuelas fueron secadas y su contenido fue vertido en una placa de Petri (35 x 10 mm) conteniendo 2.0 ml de medio de mantenimiento (PBSM), 0.4% BSA, anti-anti) durante 5 min. Los embriones luego de su evaluación morfológica fueron envasados en pajuelas de 0.25 mL y transferidos no quirúrgicamente empleando la pistola miniturizada francesa (IMV, Cassou). Los embriones fueron implantados en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo de receptoras mestizas una semana después del celo previamente sincronizado con prostaglandina F2a. El diagnóstico de gestación fue realizado por palpación rectal entre 40-50 días postransplante.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se realizaron 84 superovulaciones en 31 vacas donadoras, se obtuvo un total de 555 huevos de los cuales 330 (59.5%), 163 (29.4%) y 62 (11.2%) fueron clasificados como ET, ENT Y ONF respectivamente (cuadro 1)

Cuadro 1. Relación de producción de huevos/embriones.

Donadoras N°	Huevos Total	Embriones transferibles	Embriones No transferibles	Óvulos No fecundados
31	555	330 (59.5%)	163 (29.4%)	62 (11.2%)

Estos resultados concuerdan con los reportados en otras razas Bos Taurus (González et al., 1990) pero superior a los reportado en vacas Canchim (Táhira et al., 1993). El promedio de embriones recolectados por vacas donadoras Criollo Limonero, fue de 5.2 ± 5.9 ET, 2.6 ± 3.8 ENT y 1.0 ± 2.59 ONF. (cuadro 2).

Cuadro 2. Relación de producción de huevos embriones por vaca donadora lavada.

Lavados N°	Huevos Total	X Embriones Transferibles (por lavado)	X Embriones no transferibles (por lavado)	X Óvulos no fecundados (por lavado)
63	555	5.2 ± 5.9	2.59 ± 3.8	1.0 ± 2.59

La cantidad de 5.2 E.T. fue superior a la encontrada en otras razas y diferentes latitudes (Detterer et. Al., 1997; Kanuya et al., 1997). Un total de 89 embriones fueron transplantados, de los cuales se obtuvo un total de 39 receptoras preñadas para una tasa de preñez del 43.8%, superior a lo reportado en novillas mestizas (Roa et. Al., 1998) y similar a los reportados en medio tropical (Magahed, 1995)

Cuadro 3. Relación de embriones transplantados y tasa de preñez.

Embriones Transplantados	N° de receptoras Preñadas	Tasa de Preñez
89	39	43.8%

De estos embriones transplantados 12 fueron frescos y 77 congelados, lográndose una tasa de preñez para los frescos del 33.3% y 45.5% para los congelados (cuadro 4).

Cuadro 4. Tasa de preñez para embriones transplantados frescos y congelados.

	Embriones frescos	Embriones congelados
N° de receptoras transplantadas	12	77
N° de receptoras preñadas	04	35
Tasa de preñez	33.3%	45.5%

Con embriones frescos la tasa de preñez fue inferior a los reportados en novillas mestizas en clima tropical (Roa et. Al., 1998), pero superior con los embriones congelados.

CONCLUSIONES

Con este trabajo se ha podido demostrar el potencial del transplante de embriones como una excelente y efectiva herramienta de conservación, mejoramiento genético y difusión del ganado Criollo Limonero. Se evidencia la alta eficiencia reproductiva de esta raza al obtener un índice de fertilidad de los huevos recolectados del 88.9% y una tasa de preñez del 43.8%.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Detterer, J.; Schmidt, T.; Harzjijus, B. 1997. Factors influencing the variability in Superovulation results in German Holstein cattle. *Theriog.* 47 (1): 169.
2. Gonzlaéz, A.; Lussier, J.G.; Garruthers, T.D.; Murphy, B.B. and Mappletoft, R.J. 1990. Superovulation of beef heifers with folltropin: A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriog.* 33: 519-599.
3. Kanuya, N.; Callensen, H., Hittel, P.; Assey, R.; Greve, T. 1997. Superovulatory response of dairy cattle (*Bos Taurus*) in a tropical environment. *Theriog.* 47: 1583.
4. Lindir, G.M. and Wrigth, R.W.JR. 1983. Bovine embryo morphology evaluation. *Theriorg.* 20: 407-416.
5. Magahed, G.A. 1995. The influence of season and embryo stage on pregnancy rate of frozen – Thawed Cowembryos. *Indian Vet. J.* 72: 146: 149.
6. Roa, A N.; Linares, T.; Tamasaukas, R. 1998. Tasa de preñez en un programa comercial de transplante de Embriones frescos o congelados en Venezuela. *Rev. Cient., FCV – LUZ.* Vol. 3, Suplem. 1: 81-83.
7. Thaira, J.K. and Hackett, A.J. 1993. Superovulation of canchin cows with folltropin. *Rev. Bras. Reproducao animal.* 17 /1-2): 33.
8. Voelkel, S.A. and Xu, Y.X. 1992. Direct transfer on frozen thawed bovine embryos. *Theriog.* 37: 23-37.

BT 4 OBTENCIÓN DE POBLACIONES TOTALMENTE HEMBRAS DE TRUCHA ARCOIRIS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE REVERSIÓN SEXUAL.

Bastardo, Hilda y Sofia, Sara.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Venezuela), Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado Mérida (CIAE-Mérida). Fax=0274-2637941, 2630090. [E-mail=hildabastardo@starmedia.com](mailto:hildabastardo@starmedia.com)

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Campo Experimental Truchícola La Mucuy, ubicado en el Parque Nacional Sierra Nevada, en Mérida, Venezuela. El objetivo fue obtener poblaciones de trucha arcoiris completamente hembras a través del método de reversión sexual. Se utilizó la hormona 17 alfa metil testosterona para inducir la masculinización de las hembras. Se determinó que el uso de la hormona no afecta la sobrevivencia de los ejemplares tratados en relación al control. Se encontraron diferencias significativas, al final del período de estudio, en el crecimiento del grupo experimental y el control. El 57% del grupo experimental correspondió a hembras masculinizadas, se encontró además un 27% de hembras con gónadas atrofiadas y un 16% con gónadas normales. No se encontraron diferencias en el porcentaje de fertilidad y de nacimiento entre las truchas del grupo experimental y el control. Los cruces realizados con semen de hembras masculinizadas y hembras normales originaron una descendencia 100% hembras.

Palabras Claves: Trucha, reversión sexual, monosexo, ginogénesis.

INTRODUCCIÓN

Los cambios de sexo, a través de tratamientos hormonales pueden producir poblaciones monosexuales, el genotipo macho o hembra se determina en el momento de la fecundación, mientras que el fenotipo sexual ocurre posteriormente durante el desarrollo, especialmente en el momento del inicio de la alimentación. Este fenotipo puede alterarse por la administración de estrógenos para producir todas hembras o andrógenos para obtener poblaciones todas machos (Pérez, 1996).

El rápido desarrollo del cultivo de salmónidos durante la década de los 70 en Europa y Norteamérica incrementó el interés en controlar el sexo de estos peces, debido a los beneficios de obtener poblaciones totalmente hembras. La madurez sexual en los peces generalmente produce un efecto detrimental sobre la tasa de crecimiento por la movilización de la energía hacia el desarrollo de las gónadas (Happe et al., 1988).

La técnica más recomendada para la masculinización de hembras es la ginogénesis donde el uso de estrógenos es indirecto ya que nos permite obtener machos homogaméticos (xx), los cuales fenotípicamente se comportan como machos y genotípicamente siguen siendo hembras. Los descendientes de estos cruces son 100% hembras, los cuales pueden consumirse sin restricciones y ser utilizados en programas de reproducción. La obtención de truchas solo hembras, a través de la masculinización de hembras es ampliamente utilizada en muchos países de Norteamérica y Europa. El objetivo del presente trabajo fue obtener poblaciones completamente hembras de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, a través del proceso biotecnológico de reversión sexual.

METODOLOGÍA

Alimentación:

Esta investigación se realizó en el Campo Truchícola La Mucuy, el 11/12/98, para lo cual se utilizaron 9000 alevines procedentes de una misma cohorte, estos se dividieron en seis lotes, tres de los cuales fueron alimentados con una dieta comercial a la cual se le añadió 17 α metil testosterona, los otros tres lotes consumieron la misma dieta pero sin testosterona (grupo control).

Para la preparación del alimento se utilizó 3 mg de 17 α metil testosterona previamente disuelto en 200 ml de alcohol isopropílico, por cada kg de alimento (Bye & Lincoln, 1986). Se mezcló minuciosamente con movimientos envolventes, luego se colocó en una bandeja formando una capa delgada y se dejó secar en una estufa a 35 °C, hasta el día siguiente. Al terminar el proceso de secado se colocó en un envase con tapa y se guardó en el refrigerador. El alimento se suministró durante 75 días, cada 30 minutos durante 9 horas. Después de este período de alimentación se

les suministró su dieta normal (dieta control) hasta el final del experimento. Se llevó control de mortalidad diaria y cada tres meses se determinó peso y longitud de la población en estudio, hasta el inicio de la maduración gonadal.

Manejo de los reproductores:

Se debe extraer de la población los machos normales, los cuales se reconocen fácilmente al presionar el abdomen, si están maduros el semen sale libremente; estos ejemplares no nos interesan para el estudio que nos estamos planteando, por lo tanto deben descartarse del lote. De igual manera las hembras normales y las que presentan los ovarios atrofiados son descartadas, solo nos quedamos con las hembras masculinizadas o machos funcionales.

Fertilización:

Se tomó una muestra de 30 ejemplares de las que consumieron alimento con testosterona y 30 del grupo control para la determinación de sexo. Los ejemplares se sacrificaron debido a que el tratamiento con hormonas origina el cierre del conducto genital en las hembras masculinizadas y en el momento de la maduración el semen no encuentra salida por lo que es necesario extraer los testículos, abrirlos y presionarlos hasta la salida del semen. También ocurren cambios en la morfología de los testículos, estos se separan en varias partes, en forma de racimo y adquieren un tamaño mayor que los testículos de las truchas no tratadas. El semen no presenta la consistencia fluida de los machos normales, por el contrario es muy grumoso.

De las hembras de una misma cohorte se obtuvieron dos lotes de ovas para evaluar el grupo tratado con hormona y el grupo control. Se realizaron cuatro incubaciones de cada tratamiento, en total obtuvimos ocho grupos, cuatro para el tratamiento y cuatro para el testigo. Antes de la fertilización, las ovas se lavaron con una solución isohalina, para promover la motilidad de los espermatozoides, dilatar el micropilo y eliminar las impurezas que hayan podido caer durante el proceso. Después de 15 minutos las ovas se lavan con agua para extraer el exceso de semen, posteriormente se colocan en las incubadoras verticales.

Desde el momento de la ubicación se llevó un control diario de la temperatura del agua y se extrajeron las ovas muertas. Se determinó el número y diámetro de las ovas, la fertilidad y sobrevivencia de larvas. El conteo y el diámetro de las ovas se determinó utilizando el método de Von Bayer (1950, citado por Piper et al., 1983). La fertilidad se determinó a través de la relación entre el total de ovas embrionadas y el total de incubadas, y la sobrevivencia de larvas se estimó utilizando la relación entre el total de alevines y el total de larvas. Tanto la fertilidad como la sobrevivencia se expresaron en porcentaje. Para realizar las pruebas de progenie fue necesario esperar que las hembras masculinizadas maduraran sus gónadas para obtener el semen y poder fertilizar las ovas de truchas no tratadas. Las hembras masculinizadas comenzaron a dar muestras de cambios en el desarrollo de las gónadas a partir de enero del año 2000, cuando se observaron diferencias morfológicas entre los testículos de hembras masculinizadas y los de machos normales. A partir de los 13 meses se sacrificaron las truchas mensualmente para asegurar el momento adecuado de maduración de los testículos, prolongándose hasta los 17 meses de edad cuando casi toda la población presentó las gónadas en estado avanzado de maduración y al mes siguiente se realizaron los cruces para evaluar la progenie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Después de 933 oC días de alimentación con la hormona, se continuó con la dieta normal hasta el final del experimento. Al observar señales de maduración se dejó en el estanque solo las truchas revertidas del lote tratado con la hormona 17 alfa metil testosterona, descartando los machos normales, el resto de la población correspondió a hembras. Del total de hembras se encontró que el 16,67% no fue afectado por el tratamiento en lo que respecta a la maduración de las gónadas; el 26,67% presentó gónadas atrofiadas o truchas estériles y el 56,66% de las hembras respondieron al tratamiento hormonal, las cuales se masculinizaron o revirtieron su sexo (Fig. 1).

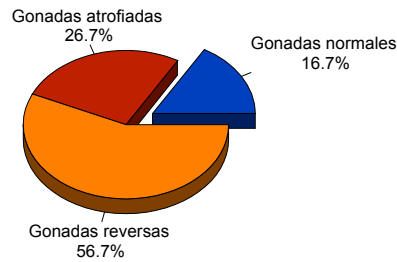


Fig. 1. Distribución de la condición de las gónadas de la trucha sometidas al tratamiento hormonal (%)

Crecimiento y sobrevivencia:

Se encontró una relación lineal altamente significativa entre la talla y el peso con un $r=0,939$ para las truchas tratadas con hormona y una ecuación de regresión: $\text{Peso} = -167,1 + 15,94 * \text{longitud}$. Las truchas control presentaron un $r=0,934$ y $\text{peso} = -212,7 + 18,977 * \text{longitud}$.

La Fig 2, muestra los pesos medios, mínimos y máximos de las truchas del grupo tratado con hormona y del control. Mientras que la Fig. 3 representa el peso (g) de las truchas tratadas con la hormona y el grupo control en función del tiempo y hasta los 17 meses de edad; se observa que las tratadas presentaron un crecimiento significativamente menor que las del grupo control ($p= 0,05$). Johnstone et al. (1978) encontraron un crecimiento menor en truchas tratadas con estrógeno, sin embargo cinco meses después del tratamiento hormonal no se encontraron diferencias significativas entre el peso de estas y el control. En nuestro caso esas diferencias se mantuvieron hasta el final del ensayo; posiblemente estas discrepancias puedan estar relacionadas con la manera de suministrar el estrógeno.

La sobrevivencia fue menor en el grupo tratado, sin embargo en ambos casos el valor fue similarmente alto, esta no descendió del 97%. Los resultados indican que la hormona, utilizada bajo las condiciones del presente estudio, no afecta la sobrevivencia de las truchas.

Pruebas de Progenie:

La evaluación del material en estudio permitió determinar la relación de sexo en cada uno de los períodos analizados (Cuadro 1), se determinó también el porcentaje de hembras normales y el porcentaje de hembras con gónadas atrofiadas dentro del grupo tratado. A través del análisis microscópico encontramos que hasta los seis meses de cultivo no se observaron óvulos en los gametos de las truchas tratadas con hormona, estos presentaron características parecidas a las de los machos, sin embargo las consideramos sin determinación de sexo. En la evaluación correspondiente al tiempo de cultivo 9 y 12 meses se observó una relación de sexo similar a la esperada en una población normal. A partir de los trece y hasta los 17 meses de cultivo hubo predominio de hembras revertidas o masculinizadas, separándose de la relación 1:1 que caracteriza a las poblaciones naturales. La revisión microscópica realizada a los ejemplares con ovarios, del grupo tratado (13 a 17 meses de cultivo), reporta características diferentes a las normales, observándose gónadas atrofiadas, como hilos, con óvulos dispersos y poco visibles, en algunos casos en una misma trucha se observó que una gónada presentaba óvulos mientras que la otra era un testículo. En contraposición al grupo control en donde los ovarios presentaron las características normales de acuerdo al tiempo de cultivo.



Fig. 2. Gráfico de caja donde se observan los pesos medios, mínimos y máximos de los grupo de truchas tratadas con hormona y el control.

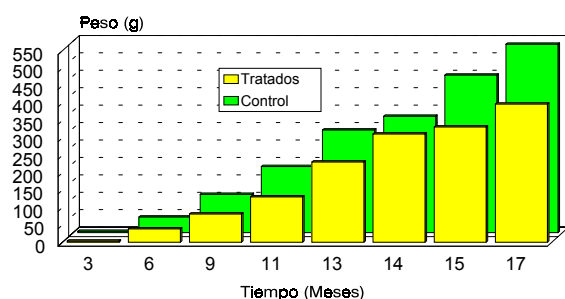


Fig. 3. Peso de las truchas del grupo experimental y el grupo control.

Cuadro 1. Relación de sexo de la trucha arcoiris, de los grupos tratados on testosterona y el grupo control, utilizando la técnica de reversión sexual.

*Gónadas atrofiadas ND= No determinado

En junio del 2000 realizamos el primer cruce entre hembras masculinizadas y hembras normales, estas pruebas de progenie son las que realmente nos van a indicar los resultados esperados de esta investigación (progenie 100% hembra). Se encontró una fertilidad muy baja tanto en los tratados como en el grupo testigo, lo cual nos podría indicar que esta baja fertilidad se puede deber a causas externas al ensayo, podría ser una sobremaduración de las ovas utilizadas, ya que se estaba iniciando el proceso de reproducción y posiblemente estas truchas habían madurado antes y el proceso se inició más tarde. A pesar de la baja fertilidad disponemos de aproximadamente 300 ejemplares procedentes del grupo tratado con hormona. De este grupo tomamos una muestra de 30 ejemplares y todos resultaron ser hembras (Cuadro 2).

Cuadro 2. Pruebas de progenie (Primera generación) de las truchas del grupo tratado con hormonas y del grupo control, en relación a crecimiento y relación de sexo.

Tiempo (meses)	Relación de sexo en el grupo tratado	Hembras normales En el grupo tratado	Hembras con gónadas atrofiadas en el grupo tratado	Relación de sexo (Control)
0 Inicio de ensayo (11-12-98)	-	-	-	-
3	ND	0	0	17H:13M
6	ND	0	0	18H:12M
9	13H:17M	13	0	17H:13M
12	15H:15M	15	0	17H:13M
13 (Enero2000)	09H*:21Mrv	0	09	13H:17M
14	05H*:25Mrv	0	05	18H:12M
15	07H*:23Mrv	0	07	17H:13M
17	06H*:24Mrv	0	06	13H:17M
Tiempo (meses)	Relación de sexo en el grupo tratado	Hembras normales En el grupo tratado	Hembras con gónadas atrofiadas en el grupo tratado	Relación de sexo (Control)
0 Inicio de ensayo (11-12-98)	-	-	-	-
3	ND	0	0	17H:13M
6	ND	0	0	18H:12M
9	13H:17M	13	0	17H:13M
12	15H:15M	15	0	17H:13M
13 (Enero2000)	09H*:21Mrv	0	09	13H:17M
14	05H*:25Mrv	0	05	18H:12M
15	07H*:23Mrv	0	07	17H:13M
17	06H*:24Mrv	0	06	13H:17M

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al apoyo financiero del CONICIT a través del Proyecto BTA-13 del Programa Nuevas Tecnologías.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Bye, V.J. & Lincoln, R.F. 1986. Commercial methods for control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). Aquaculture, 57:299-309.
2. Happe, A., Quillet, E. & Chevassus, B. 1988. Early life history of triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture, 71:107-118.
3. Johnstone, R., Simpson, T. H. & Youngson, A. F. 1978. Sex reversal in salmonid culture. Aquaculture, 13:115-134.
4. Perez, J. E. 1996. Mejoramiento genético en acuicultura. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná. 178 pp.
5. Piper, R.G.; McElwain, I.B.; McCraren, J.P.; Fowler, L.G. & Leonard, J.R. 1983. Fish hatchery management. Fish and Wildlife Service. Washington, D.C. 370 pp.

BT 7 UTILIZACIÓN DE UN ESQUEMA ACTUALIZADO DE SUPEROVULACIÓN, RECOLECCIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES DE CABRAS EN MÉXICO

Dickson U. Luis.¹, Rangel S. Raymundo.², Torres H. Glafiro.³, Becerril P. Carlos.³, González C. Félix.³.

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), CIAE-LARA, Km 7 vía Barquisimeto-Duaca, “ElCují”, Edo. Lara, Venezuela. ¹ luisdickson_urdaneta@hotmail.com

²Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Edo. de México, C.P. 56230

³Colegio de Postgraduados, Km 35.5, Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, C.P. 56230

RESUMEN

Con el fin de obtener un mayor número de crías de las hembras con una alta producción de leche, 14 cabras (7 Alpinas y 7 Saanen) se sometieron a un esquema actualizado de superovulación, recolección y transferencia de embriones. Las cabras se sincronizaron utilizando esponjas intravaginales con 45 mg de FGA durante 11 días y la inyección I.M. de 7.5 mg de luprositol el día del retiro de la esponja. La superovulación se hizo mediante la inyección de 280 mg de FSH en dosis decrecientes y la inyección I.M. de 250 UI de PMSG. Las cabras se inseminaron 12 h después de la detección del estro vía intrauterina con semen congelado comercial. Se colocó intravaginalmente una esponja con FGA después de la inseminación y hasta el día de la recolección de embriones, la cual se efectuó el día 7 posterior a la inseminación mediante laparotomía medio ventral. Se observaron en promedio 11 cuerpos lúteos/cabra. Sin embargo, de las cabras que mostraron respuesta superovulatoria, el 45.5% presentó sólo ovocitos sin fertilizar al momento de la evaluación. De 6 donadoras (3 Alpinas, 3 Saanen) se obtuvieron en total 36 embriones, de los cuales 30 (83.3%) se consideraron viables. De un total de 15 receptoras se obtuvieron 10 crías. Aunque los resultados obtenidos de la superovulación y la recolección de embriones son alentadores, la tasa de fertilidad utilizando semen congelado debe mejorarse antes de que esta técnica pueda ser utilizada comercialmente para los fines deseados.

Palabras clave: Superovulación, transferencia, embriones, cabras.

INTRODUCCIÓN

El procedimiento de superovulación, recolección y posterior transferencia de embriones a hembras receptoras sincronizadas ha demostrado ser un procedimiento efectivo para aumentar la contribución de hembras superiores al promedio del pool genético en poblaciones, especialmente en vacas (Armstrong, 1983). Sin embargo, la aceptación de esta tecnología en las cabras ha sido lenta y se ha limitado al intercambio internacional de material genético y programas de producción de animales transgénicos (Chemineau *et al.*, 1999).

La poca utilización de esta técnica para aumentar el progreso genético obtenido en rebaños comerciales se debe principalmente a la variabilidad en las respuestas obtenidas en el tratamiento superovulatorio (Cognie, 1999); sin embargo, avances recientes como el establecimiento de métodos para superovular con menor variación en cuanto a la respuesta (Pintado *et al.*, 1998), la disponibilidad comercial de semen congelado de alto valor genético y la utilización de esponjas intravaginales con acetato de fluorogestona (FGA) después de la inseminación y hasta el día de la recolección para evitar el deterioro de los embriones causado por la incidencia de regresión temprana del cuerpo lúteo (Mejía *et al.*, 2000), han mejorado las posibilidades de aplicación de esta tecnología.

El objetivo del presente trabajo fue utilizar los avances más recientes en la superovulación, recolección y transferencia de embriones, con el fin de obtener un mayor número de crías de las hembras con mejor producción de leche de un rebaño de cabras en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el rebaño experimental de cabras de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicado a 2,250 msnm cercano a la ciudad de Texcoco, Estado de México. El manejo general del rebaño consistió en la alimentación bajo estabulación con Alfalfa (*Medicago sativa*), heno de pasto Rye grass (*Lolium perenne L.*) y la

suplementación de aproximadamente 1 kg/cabra de alimento concentrado comercial. Los animales estuvieron estabulados en corrales parcialmente techados y separados, de acuerdo al sexo y estado productivo.

Tanto las cabras donadoras como receptoras fueron sincronizadas utilizando esponjas intravaginales con 45 mg de FGA* durante 11 días y una inyección IM de 7.5 mg de luprositol*** el día del retiro de la esponja. Con el fin de mejorar la respuesta ovulatoria, las receptoras recibieron una dosis de 500 UI de suero de yegua preñada (PMSG)** 48 h antes del retiro de la esponja.

Como donadoras se seleccionaron 14 cabras multíparas (7 Alpino y 7 Saanen), utilizando como criterio principal para la selección el promedio diario de producción de leche, el cual tenía que ser superior a los 3.5 lt/día en lactancias mayores de 200 días.

La superovulación se efectuó mediante la inyección intramuscular de 14 ml (280 mg) de hormona folículo estimulante (FSH)**** en dosis decrecientes cada 12 h durante 4 días (2.5, 2.5, 2.0, 2.0, 1.5, 1.5, 1.0, 1.0), iniciando en el día 3 antes del retiro de la esponja y la inyección de 250 UI de PMSG en una dosis única, el día del retiro de la esponja.

Las donadoras fueron inseminadas 12 h después de la detección del estro vía intrauterina, utilizando 2 dosis de 0.25cc de semen congelado importado (CAPRI-IA, SERSIA-France). La detección del estro se llevó a cabo introduciendo cada 6 h en el corral un macho con desviación quirúrgica de pene. Con el fin de disminuir la pérdida de embriones ocasionada por la regresión temprana del cuerpo lúteo, se colocó una esponja con 45 mg de FGA 12 horas después de la inseminación y hasta el momento de la colección de los embriones (Mejía *et al.*, 2000).

El lavado de los cuernos uterinos y la recolección de embriones se realizó mediante laparotomía medio ventral (Baril *et al.*, 1995), previa evaluación de la respuesta superovulatoria con el uso de un endoscopio, efectuada el día 7 después de la inseminación.

Se evaluaron los embriones obtenidos y 2 embriones de buena calidad fueron transferidos en el cuerno uterino ipsilateral al sitio de ovulación en receptoras que presentaron 2 o más cuerpos lúteos, cuando fueron evaluadas mediante observación endoscópica el día de la transferencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 14 cabras sometidas al tratamiento de superovulación, 3 (21.4%) no presentaron respuesta superovulatoria al ser evaluadas con el endoscopio. Este resultado es similar al que obtuvieron Nuti *et al.* (1987), quienes observaron que el 23.2% de las cabras Angoras y Alpinas sometidas al tratamiento superovulatorio utilizando FSH mostraron refractoriedad al tratamiento.

Se observaron 121 cuerpos lúteos (CL) en un total de 11 cabras (11 CL/cabra), no se encontró una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las 2 razas. Esta respuesta es superior a la que obtuvieron Pintado *et al.* (1998), quienes observaron un promedio de 9.3 CL en cabras Murcianas utilizando una combinación de FSH y PMSG para el tratamiento de superovulación similar al utilizado en el presente trabajo.

Al momento de la recolección 5 donadoras (45.5%) presentaron sólo ovocitos sin fertilizar, lo que disminuyó drásticamente los resultados obtenidos. Baril *et al.* (1995) consideran que la corta duración de la supervivencia espermática después de descongelar, asociada a la imprecisión respecto del momento de la ovulación, constituye un factor limitante para la utilización de semen congelado en la producción de embriones.

De un total de 6 donadoras (3 Alpinas, 3 Saanen) se obtuvieron 36 embriones (6 embriones/donadora), de los cuales 30 (83.3%) se consideraron viables. Este valor es superior al que obtuvieron Pintado *et al.* (1998), quienes, aunque

* (Chronogest, Intervet)

** (Folligon, Intervet)

*** (Prosolvin Intervet)

**** (Folltropin, Vetrepfarm)

reportaron un promedio similar de 6.2 embriones por cabra, sólo lograron un 46.5% de embriones viables debido a que encontraron una alta incidencia de regresión temprana de cuerpo lúteo, la cual para el momento no tenía una solución práctica, según estos autores. La introducción de la esponja con FGA probablemente fue la razón del buen porcentaje de embriones viables obtenidos en este trabajo.

Un total de 15 receptoras recibieron 2 embriones en el cuerno uterino ipsilateral a la ovulación, de las cuales 7 cabras resultaron gestantes obteniéndose un total de 10 crías nacidas (46.7%). Esto se encuentra en el límite inferior del rango de 45 a 80% considerado como aceptable por Godke et al. (1985) dependiendo de la calidad de los embriones, el estado de nutrición de las cabras y la experiencia de los técnicos. Aunque se encontró una diferencia significativa ($P<0.05$) entre razas para el número de crías obtenidas (tabla 1), esta se debió probablemente al bajo número de animales utilizados.

Tabla 1. Respuesta obtenida a la superovulación, recolección y transferencia de embriones según la raza.

Raza	No. de donadoras	CL	Embriones recuperados	Embriones transferidos	Crías nacidas
Alpina	3	21	17	14	7 _a
Saanen	3	27	19	16	3 _a

a,b diferente literal en la misma columna son diferentes estadísticamente ($P<0.05$)

CONCLUSIONES

Aunque los resultados de superovulación y recuperación de embriones viables obtenidos en el presente estudio son alentadores, la tasa de fertilidad con semen congelado debe mejorarse, antes de que un programa de superovulación y transferencia de embriones pueda ser implementado comercialmente para los fines del presente trabajo.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Armstrnog, D., A. Pfitzner, G. Warnes y R. Seamark. 1983. Superovulation and embryo transfer in Angora goats. J. Reprod. Fert., 67: 40-410.
2. Baril, G., P. Brebion y P. Chesne. 1995. Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. FAO. Roma, 1995. 175 p.
3. Chemineau, P., G. Baril, B. Lebouef, M. Maurel, F. Roy, M. Pellicer-Rubio, B. Malpoux y Y. Cognie. 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. J. Reprod. Fertil., 54: 129-142.
4. Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology, 51: 105-116.
5. Godke, R., T. Overskei y S. Voelkel. 1985. The potential of micro-manipulation and embryo transfer in breeding goats. Dairy Goat J., 63: 154-157.
6. Mejía, O., C. Murcia, J. Valencia y F. Espinosa. 2000. Administración postmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. Vet. Mex., 31: 129-135.
7. Nuti, L., B. Minhas, W. Baker, J. Capehart y P. Marrack. 1987. Superovulation and recovery of zygotes from Nubian and Alpine dairy goats. Theriogenology, 28: 481-488.

8. Pintado, B., A. Gutiérrez-Adán y B. Pérez-Llano. 1998. Superovulatory response of Murciana goats to treatments based on PMSG/anti-PMSG or combined FSH/PMSG administration. *Theriogenology*, 50: 357-364.