



## Contenido

### Publicación de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

#### REDACTOR RESPONSABLE

Prof. Walter García Vidal, DMV MSc.  
Academia Nacional de Veterinaria

#### CONSEJO EDITOR

Aldrovandi, Ariel; DMTV

Facultad de Veterinaria

Brussa, Yolanda; DMTV

Ejercicio Liberal

Carro, Silvana; DMTV

Facultad de Veterinaria

Colombo, Alicia; DMTV;

Facultad de Veterinaria

Kremer, Roberto; DV; MSc.

Facultad de Veterinaria

Maisonnave, Jacqueline; DV; PhD.

Facultad de Veterinaria

Perez C., Raquel; DV; MSc

Facultad de Agronomía

Puignau, Juan P. DMV;

IICA - Uruguay

Rimbaud, Enrique; DMTV;

Ejercicio Independiente

Saizar, Julia; DMV;

DILAVE "Miguel C. Rubino"

Solari, María, A.; DV;

DILAVE "Miguel C. Rubino"

#### ASESOR

Bibliotecóloga Elba Dominguez,

Técnico de Hemeroteca, Dpto. Doc. y

Biblioteca, Facultad de Veterinaria,

Montevideo - Uruguay.

#### EDITOR

Walter Roel

Ediciones Maya

Joaquin de Salterain 1520 - Tel. 417596

#### PUBLICIDAD

Luis Roel

Tel. 63 16 64

#### COMPOSICION ARMADO Y DIAGRAMACION

Dra. Ana M. Cóppola

#### IMPRESION

Tall. Graficos Vanguardia S.A.

Dep. Legal 8268/94

### Editorial

3

### Valor nutritivo de distintos ensilados en la alimentación del ganado lechero

*D'Alessandro, J.L.; Corengia, C.F.; Repetto, J.L.  
Cajarville, C.; Echarrri, V.; Hareau, M.*

4

### Generación de marcadores macho específicos para la determinación de sexo bovino por PCR

*Hirigoyen, D; Bruzzoni Giovanelli, H.;  
Azambuja, C.; Stoll, M.*

12

### Inseminación artificial a tiempo fijo en cabras criollas

*Romano, J.E.; Ayala, M; Lago, I.; Cuñarro, B.*

19

### Primera obtención de dos preñeces en vacunos por embriones producidos in vitro en el Uruguay

*Larocca, C; Kmaid, S.; Romano, J.E.;  
Calvo, J.; Vigueira, M.; Dochi, O*

23

### Asesoramiento en endoparasitosis de ovinos: 7 años de experiencia.

*Lorenzelli, E.; Macchi, M.I.; Dondo, E.*

25

Esta edición consta de 2.500 ejemplares y se distribuye sin costo a todos los socios de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay. Por suscripciones: ANTEL : 62.08.73c/u N\$ 10.000, anual (4) N\$ 32.000. Las suscripciones no canceladas antes del 31 de diciembre de cada año se considerarán tácitamente renovadas para el año siguiente. Esta publicación no se responsabiliza por los conceptos vertidos por los autores. Se autoriza la reproducción total o parcial de los resúmenes editados mencionando la fuente. Canje de Revista "VETERINARIA" a cargo del Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria (convenio SMVU/Fac. Vet. 16/12/1988).

FOTO CARATULA: CASA DEL VETERINARIO - CERRO LARGO 1895

30 octubre 2001  
Donación

**COMITE DE ARBITROS DE TRABAJOS CIENTIFICOS**

1989 - 1993

ALVES P., C.	(DMV)	BRASIL	NARI, A.	(DMV)	URUGUAY
AZZARINI, M.	(Ing. Agr.)	URUGUAY	NIETO, A.	(DQ)	URUGUAY
BOSCH, R.	(DMV)	ARGENTINA	PERDOMO, E.	(DMV)	URUGUAY
CAPANO, F.	(DMV)	URUGUAY	PEREZ CLARIGET, R.	(DMV)	URUGUAY
CASAS OLASCOAGA, R.	(DMV)	URUGUAY	QUINONES S., C.	(DMV)	URUGUAY
CARBALLO, M.	(DMV)	URUGUAY	QUINONES, J.	(DMV)	ARGENTINA
CARDOZO, H.	(DMV)	URUGUAY	RIET ALVARIZA, F.	(DMV)	URUGUAY
CAVESTANY, D.	(DMV)	URUGUAY	RIET CORREA, F.	(DMV)	BRASIL
CORENGIA, C.	(PROF)	URUGUAY	RODRIGUEZ, M. I.	(DMV)	ARGENTINA
da SILVEIRA OSORIO, J.C.	(DMV)	BRASIL	RODRIGUEZ, A.M.	(Ing. Agr.)	URUGUAY
DURAN DEL CAMPO, A.	(DMV)	URUGUAY	SCARSI, R.	(DMV)	URUGUAY
ERLICH, R.	(Lic. Biol.)	URUGUAY	RODRIGUEZ H.	(DMV)	SUECIA
FERNANDEZ, D.	(Ing. Agr.)	URUGUAY	TOLOSA, J. S.	(DMV)	ARGENTINA
FORCHETTI, O.	(DMV)	ARGENTINA	TONNA, H.	(DMV)	URUGUAY
GUARINO, H.	(DV)	URUGUAY	TORTORA, J.	(DMV)	MEXICO
HOLENWINGER, J.	(DMV)	URUGUAY	VAZQUEZ, M.	(DMV)	ARGENTINA
LOPEZ PEREZ, A.	(DV)	URUGUAY	VIDOR, T.	(DMV)	BRASIL
MARTIN E.	(DMV)	ARGENTINA	YARZABAL, L.	(DM)	URUGUAY

**SOCIEDAD DE MEDICINA VETERINARIA DEL URUGUAY**

**CONSEJO DIRECTIVO**

**PRESIDENTE:**

Dr. Hugo Fontaiña

**VICE-PRESIDENTE:**

Dr. Julio García Lagos

**SECRETARIO:**

Dr. Ignacio Pereira

**PRO SECRETARIO:**

Dra. María A. Solari

**TESORERO:**

Dra. Adriana Rodríguez

**PRO TESORERO:**

Dr. Luis Delucchi

**SECRETARIA DE ACTAS:**

Dra. Virginia Diana

**ASOCIACIONES ESPECIALIZADAS QUE INTEGRAN LA S.M.V.U.**

- COMISION DE REPRODUCCION E INSEMINACION ARTIFICIAL
- SOCIEDAD DE BUIATRIA DEL URUGUAY
- COMISION DE INDUSTRIA PESQUERA Y ACUICULTURA
- ASOCIACION DE VETERINARIOS EN EL AREA DE LA CARNE
- ASOCIACION URUGUAYA DE VETERINARIOS LABORATORISTAS

**CENTROS VETERINARIOS AGRUPADOS EN LA SOCIEDAD**

**ARTIGAS**

Dra Marianela Acevedo  
L. A. de Herrera 380  
C.P. 55.000

**TOMAS GOMENSORO**

Dr. Nelson Barreda  
25 de Agosto s/n C.P. 55.002

**PANDO**

Dr. Eduardo Bianchi  
25 de Mayo 1017 C.P. 91.000

**CERRO LARGO**

Dr. Alfredo Fratti  
Navarrete 687/4  
C.P. 37.000 Meló

**COLONIA**

Dr. Guillermo Piferrer  
Límite Oeste 1818  
C.P. 70.002 Tarariras

**DURAZNO**

Dr. Michel Despaux  
19 de Abril 1191 C.P. 97.000

**FLORES**

Dr. Hugo Rusiñol  
Batlle y Ordóñez 893  
Trinidad C.P. 85.000

**FLORIDA**

Dr. Rodolfo Azaletto  
Cardozo 495 C.P. 94.000

**LAVALLEJA**

Dra. Amalia Villalba Porta  
Rodó 424  
Minas C.P. 30.000

**MALDONADO**

Dr. Juan C. Dibarbouré  
Cno Velázquez y B. Mitre  
Maldonado C.P. 20.000

**PAYSANDU**

Dr. Eduardo Paradiso  
Uruguay 1189 C.P. 60.000

**RIO NEGRO**

Dr. Carlos De Mateo  
19 de Abril 1920

Young C.P. 65.100

**RIVERA**

Dr. Rafael Piazze  
L. A. de Herrera 536  
Rivera C.P. 40.000

**ROCHA**

Dr. Pablo Pertusso  
25 de Mayo 116  
C.P. 27.000 Rocha

**SALTO**

Dr. Julio Hirigoyen  
Amorín 55 C.P.  
50.000 Salto

**SAN JOSE**

Dr. Jorge Marra  
18 de Julio 589  
C.P. 80.000 San José

**SORIANO**

Dr. Hugo Suárez  
Sarandí 430  
C.P. 75.000 Mercedes

**TACUAREMBO**

Dr. Antonio Albernaz  
Ituzaingó y Gral. Flores  
(Asoc. Rural)

C.P. 45.000 Tacuarembó

**PASO DE LOS TOROS**

Dr. José Baptista  
18 de Julio 431  
C.P. 45.100 Paso de los Toros

**TREINTA Y TRES**

Dr. Fernando Dutra  
M. Meléndez 1194  
C.P. 33.000 T. y Tres

**CHUY**

Dr. Carlos Aristimuño  
Laguna de Rocha 521  
C.P. 27.100 Chuy

**SANTA LUCIA**

Dr. Gustavo Naya  
Rivera 330  
C.P. 90.700

## Premio Nacional de Veterinaria 1994



**E**l 23 de noviembre de 1994 se constituye en un día a ser recordado por la Profesión Veterinaria, pues a la celebración del día del Veterinario en el Uruguay, se agregó la institucionalización del Premio Nacional de Veterinaria.

En dicha oportunidad, con la presencia de los Ministros de Educación y Cultura y Ganadería, Agricultura y Pesca, Dr. Antonio Mercader e Ing. Agr. Gonzalo Cibils respectivamente, se hizo entrega de dicho Premio al equipo de Parasitología de la Dirección de Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino", integrado por los Dres. Armando Nari, Herculano Cardozo, María A. Solari, Miguel Franchi, Stella Quintana y los Técnicos Agropecuarios Daniel Acosta y Eduardo Rizzo.

Ellos concursaron con un trabajo relacionado a Epidemiología y Control de Parásitos Gastrointestinales, Fasciola hepática, Garrapata y Hematozoarios en Bovinos.

Esta distinción instituída por la Academia Nacional de Veterinaria tiende a estimular la investigación en materias relativas a Ciencias Veterinarias.

El Dr. Roberto Caffarena, Presidente de la Academia Nacional de Veterinaria, al dar la bienvenida a los participantes exhortó tanto a instituciones públicas como privadas a sumarse al esfuerzo realizado por el Ministerio de Educación y Cultura para apoyar los trabajos científicos realizados en el país en el área veterinaria.

En nombre de la Comisión Especial que evaluó los trabajos presentados, el Dr. Roberto Kremer destacó la calidad y la diversidad de áreas temáticas desarrolladas, lo que demandó una intensa labor para poder determinar el ganador, todo lo cual avala el interés y la profesionalidad con que los Veterinarios encararon su participación en esta instancia.

La Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay, se congratula por la feliz iniciativa de la Academia, que sin duda, contribuirá decididamente a la promoción de la investigación en áreas de importancia para el desarrollo agropecuario del país y la salud pública.

# Valor nutritivo de distintos ensilados en la alimentación del ganado lechero

D'Alessandro, J.L., Corengia, C.F.; Repetto, J.L.;  
Cajarville, C.; Echarri, V.; Hareau, M.\*

## RESUMEN

Durante los años 1988 y 1989 se analizaron 131 muestras de diferentes silos.

Se determinó en cada uno de ellos pH, Materia Seca (MS), Proteína Bruta (PB), Fibra Acido Detergente (ADF), nitrógeno insoluble en ácido detergente (ADIN), Cenizas, Calcio, Fósforo, Energía Neta de Lactación (E.N. Lact.) y Coeficiente de Digestibilidad de la Materia Seca (CDMS).

Se evaluó: a) Correlación entre pH y M.S. y pH y ADIN/PB; b) diferencias entre años, de los valores de PB y E.N. Lact.; c) diferencias entre los distintos tipos de silo en los diferentes parámetros evaluados.

Se encontró: a) Correlación negativa entre pH y Materia Seca en los silos de Pradera, y correlación positiva entre pH y ADIN Proteína en los silos de Sorgo-Maíz. b) Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre años en el tenor de PB para los silos de maíz. c) Diferencias en distintos parámetros ( $p < 0.001$ ) en relación a los silos comparados.

**Palabras clave:** Valor Nutritivo, silos, alimentación, ganado lechero.

## SUMMARY

During the years 1988 to 1989, 131 samples from different ensilages were examined.

In every one: pH, Dry Mater (DM), Crude Protein (CP), Acid Detergent Fiber (ADF), Acid Detergent Insoluble Nitrogen (ADIN), Ashes, Calcium, Phosphorus, Net Energy of Lactation (NELact.) and Digestible Dry Mater (DDM) were determined.

The following was evaluated a) correlation between pH and DM and pH and ADIN/CP; b) the difference between years, of the values of CP and NELact.; c) difference between the different types of ensilages in the different parameters evaluated.

We found: a) negative correlation between pH and NELact. in the ensilages of the prairie and positive correlation between pH and ADIN/CP in the ensilages of sorghum-corn; b) significant difference ( $p < 0.05$ ) between years in the contents of CP for the ensilages of corn; c) differences in the distinct parameters in relation to the ensilages compared.

**Key words:** Nutritive value, silos, feeding, dairy cattle.

## INTRODUCCION

Desde el año 1987 la Cátedra de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria se encuentra desarrollando una línea de investigación en relación al tema "Ensilaje en la alimentación del ganado lechero" motivada por la inquietud

planteada por grupos de productores, así como por los técnicos actuantes en estos grupos de disponer de información nacional sobre la composición nutritiva de los diferentes tipos de ensilajes.

Si bien existe abundante información internacional sobre

este aspecto (1) (4) (8) (12), así como de países limítrofes (11) (13) (20), son pocos los datos disponibles a nivel nacional.

De las conclusiones de Corengia y col (2) (3) evaluando ensilajes de la cuenca lechera del departamento de Florida resalta la diferencia entre los valores nacionales y extranjeros,

\* Docentes del Departamento de Nutrición Animal. Facultad de Veterinaria. Lasplacas 1620. 11600 Montevideo, Uruguay



destacándose los tenores muy bajos de Proteína bruta en los silos de maíz y mezcla de maíz y sorgo, así como el bajo valor energético de los silos de pradera y los insuficientes tenores de fósforo de las muestras analizadas.

Los trabajos de Repetto y col (17) comparando resultados de silos de maíz en dos años sucesivos plantean la diferencia entre años en la composición de los mismos.

Otros resultados analíticos son presentados por Pigurina y Methol (16).

Es el objetivo de este trabajo evaluar los diferentes ensilados desde el punto de vista nutricional, a fin de contar con información nacional que sirva como apoyo a los técnicos, tanto en el momento de balancear una dieta, como de tomar decisiones económicas en cuanto a futuras estrategias de

alimentación.

#### MATERIALES Y METODOS

El muestreo se realizó durante los años 1988 y 1989, con muestras provenientes el primer año de productores del Grupo Cardal del Departamento de Florida, a las cuales se sumaron en el segundo año, silos de las Colonias San Javier y Tomás Berreta del departamento de Río Negro; y silos del departamento de Colonia y San José.

El total de muestras analizadas fue de 36 para el año 1988 y de 95 para el año 1989.

El tipo y número de muestras recibidas obligó a que se clasificaran en forma diferente en cada año. En 1988 se clasificaron en 4 grupos, a saber: Sorgo-Maíz, Pradera, Maíz grano lechoso y Maíz grano duro.

En el segundo año se formaron 4 grupos diferentes, el primero comprende los silos de Maíz, que a diferencia del año anterior no se dividieron en dos grupos (grano duro y grano lechoso) ya que debido a las condiciones ambientales la colección del forraje se realizó en todos los casos con Maíz de grano duro. Los restantes grupos comprenden: Silos de Pradera, Sorgo y Sorgo-Maíz. Es de destacar que el año 1989 presentó condiciones climáticas muy especiales, caracterizándose por una intensa sequía que determinó situaciones muy desfavorables para la producción de forraje.

#### Extracción y recepción de muestras

Las muestras fueron extraídas en la mayor parte de los casos por



## La pequeña dosis de grandes resultados

# Fostamisol®

**ANTHELMINTICO INYECTABLE**  
FOSFATO DE LEVAMISOL AL 22,3%



**Instituto  
San Jorge  
Bagó s. a.**



**LABORATORIO URUGUAY**  
J.J. DESSALINES 1831-35 TEL. 69 29 45  
MONTEVIDEO - URUGUAY.

C. AUGSBURGER

alguno de los integrantes del equipo de trabajo. Se empleó una sonda cilíndrica de 30 cm de altura por 10 cm de diámetro, con borde afilado y mango de 1,5 m. Este instrumento dio muy buenos resultados para las muestras de silos de Maíz y los de Sorgo y Maíz pero no fue efectiva para los silos de Pradera. En estos últimos hubo que recurrir a la extracción manual. En todos los casos se eliminaron por lo menos los primeros 50 a 60 cm superiores y las muestras obtenidas fueron colocadas inmediatamente en bolsas de polietileno, a las que se extrajo el aire y se refrigeró, siguiendo las recomendaciones dadas por Corengia y col (2). Una vez en el laboratorio se determinó pH y Materia Seca, y en los casos en que no se realizó esto de inmediato, las muestras fueron congeladas hasta el momento del análisis.

#### Análisis realizados

Los análisis realizados fueron: pH, Materia seca (M.S.), Proteína

bruta (P.B.) Fibra Acido Detergente (ADF), Nitrógeno Insoluble en Fibra Acido Detergente (ADIN), Cenizas, Calcio y Fósforo.

Las técnicas empleadas en cada caso fueron:

\* **pH.** El mismo se midió con un potenciómetro digital con lectura a la centésima, de acuerdo a la técnica descrita por Corengia y col (2).

\* **Materia Seca.** Se determinó por secado a peso constante de la muestra en estufa a 60°C según las recomendaciones de Giger y Pochet (5).

\* **Proteína Bruta.** Se determinó por el método de Kjeldhal empleándose un equipo Tecator macro (9).

\* **Fibra Acido detergente.** El análisis se hizo de acuerdo a la técnica de Van Soest (6) (18) (19).

\* **Nitrógeno insoluble en Fibra Acido Detergente.** Se determinó sobre el residuo de Fibra Acido Detergente empleándose el método de Kjeldhal (6) (18) (19).

\* **Cenizas.** Se midieron por incineración de la muestra en mufla

a 550°C.

\* **Calcio.** Se empleó la técnica compleximétrica usando EDTA y Murexida como indicador (14).

\* **Fósforo.** Se valoró por técnica espectrofotométrica usando molibdato de amonio y Acido Amino naftol sulfónico como activador (7).

#### Cálculo de Energía neta para lactación

La Energía fue calculada por ecuaciones de regresión en base a los resultados de Fibra Acido Detergente obtenidos, según Martin y col (10). Las fórmulas empleadas fueron:

Silos de pradera:

$$ENLact (Mcal/kg) = [1.044 - (ADF\% \times 0.0131)] \times 2.2$$

Silos de maíz y Silos de sorgo:

$$ENLact (Mcal/kg) = [(NDT\% \times 0.01114) - 0.054] \times 2.2$$

$$NDT\% = 87.84 - (ADF\% \times 0.7)$$

#### Cálculo de Coeficiente de digestibilidad de la materia seca

El Coeficiente de digestibilidad

Cuadro N°1

### Resultados promedio de los silos del año 1988

	Pradera	Maíz grano duro	Maíz grano lechoso	Sorgo/maíz
pH	5.04	3.95	3.74	4.54
M.S.%	23.36	38.00	24.20	27.54
P.B.%	11.04	5.56	5.07	4.84
ADF%	48.26	29.60	40.00	38.68
ADIN%	2.65	0.57	0.72	0.94
ADIN/P.B.%	23.76	10.80	14.60	20.24
Cenizas %	6.77	5.45	9.63	7.81
Calcio %	1.42	0.39	0.49	0.46
Fósforo %	0.14	0.15	0.16	0.11
ENL Mc/K	0.90	1.52	1.34	1.37
CDMS %	50.69	65.86	57.75	58.77
N° de muestras	8	9	5	12

M.S. (Materia Seca); P.B. (Proteína Bruta); ADF (Fibra Acido Detergente); ADIN (Nitrógeno Insoluble en Fibra Acido Detergente); ADIN/P.B. (% de ADIN en relación al % de P.B.); ENL Mc/K (Energía Neta Lactación Megacalorías/Kilo); CDMS (Coeficiente de Digestibilidad de la Materia Seca).

**Cuadro N° 2**  
**Resultados promedio de los silos del año 1989**

	Pradera	Sorgo	Maíz	Sorgo/Maíz
pH	4.32	4.18	4.09	4.13
M.S.%	26.18	28.70	29.34	21.75
P.B.%	10.91	6.13	7.61	5.65
ADF%	43.17	39.81	31.62	42.76
ADIN%	2.57	0.98	0.61	0.81
ADIN/P.B.%	24.50	18.35	8.62	15.52
Cenizas %	10.45	9.11	7.48	8.49
Calcio %	1.43	0.48	0.68	0.51
Fósforo %	0.17	0.11	0.13	0.19
ENL Mc/K	1.05	1.35	1.49	1.30
CDMS %	55.27	57.89	64.27	55.59
N° muestras	13	15	23	4

de silos para los distintos parámetros evaluados a través de test de diferencias entre medias. En todos los casos se fijó un nivel de confianza de 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en el correr del año 1988 se presentan resumidos en el Cuadro N°1.

Los resultados obtenidos en el correr del año 1989 se presentan resumidos en el Cuadro N°2

Los datos de los dos años fueron promediados y los resultados se presentan en los cuadros N° 3, 4, 5 y 6.

de la materia seca se calculó por regresión lineal a partir del porcentaje de Fibra Acido Detergente (10), empleándose la siguiente fórmula:

$$CDMS = 88.9 - (0.779 \times ADF\%)$$

### Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizaron los métodos de regresión lineal simple, análisis de varianza y Test de diferencias entre medias. A través de estas técnicas se buscó:

A) Correlaciones entre pH y Materia seca y pH y ADIN/PB, en base a la hipótesis de que la variación del porcentaje de materia seca puede afectar el pH, así como el pH modificar la cantidad de Nitrógeno de Maillard (2). Para esto se empleó el método de Regresión lineal simple.

B) Diferencias entre años (1988 y 1989) en relación a los valores de Proteína bruta y Energía Neta de Lactación dentro de cada uno de los grupos de silos por separado a través de análisis de varianza para Proteína bruta y Test de diferencias entre medias para Energía Neta de Lactación.

C) Diferencias entre los grupos

**Cuadro N° 3**  
**Resultados de los silos de Maíz**

N° de muestras: 37

	Media	STD	C.V.
pH	4.32	0.70	17.48
M. Seca %	30.75	8.54	27.77
P.B.%	6.77	1.68	24.76
ADF%	32.25	5.47	16.97
ADIN%	0.61	0.20	33.04
ADIN/P.B.%	9.96	4.79	48.11
Cenizas %	7.27	2.73	37.59
Calcio %	0.58	0.23	38.80
Fósforo %	0.14	0.05	38.26
ENL. Mc/K	1.48	0.09	6.30
CDMS%	63.78	4.26	6.68

**Cuadro N° 4**  
**Resultados de los silos de Pradera**

N° de muestras: 21

	Media	STD	C.V.
pH	4.59	0.88	19.18
M. Seca%	25.11	3.85	15.35
P.B.%	10.96	2.17	19.83
ADF%	45.11	6.62	14.68
ADIN%	2.60	1.21	46.45
ADIN/P.B.%	24.24	11.82	48.77
Cenizas %	9.05	3.31	36.63
Calcio %	1.43	0.42	29.71
Fósforo %	0.20	0.16	83.66
ENL. Mc/k	1.00	0.19	19.35
CDMS %	53.76	5.16	9.60

Cuadro N° 5

**Resultados de los silos de Sorgo y Maíz**

N° de muestras: 16

	Media	STD	C.V.
pH	4.44	0.90	20.34
M. Seca%	26.09	5.95	22.82
P.B.%	5.04	1.15	22.75
ADF%	39.70	4.15	10.44
ADIN%	0.91	0.17	18.86
ADIN/P.B.%	19.07	5.98	31.38
Cenizas %	7.97	1.42	17.80
Calcio %	0.47	0.21	45.22
Fósforo %	0.13	0.07	53.29
ENL. Mc/k	1.35	0.07	5.20
CDMS %	57.98	3.23	5.57

**B) Diferencias entre años 1988 y 1989 para Proteína Bruta y Energía Neta de Lactación**

En los silos de maíz, con relación a la Proteína Bruta, se encontraron diferencias significativas entre años, ( $p < 0.05$ ) tanto en la comparación con el maíz grano lechoso como con el maíz grano duro.

En relación a la Energía Neta de Lactación, los silos del año 1989 no mostraron diferencias significativas con el maíz grano duro de 1988. Sin embargo, se encontraron diferencias comparándolo con el grano lechoso de 1988 ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias entre años para los otros grupos de silos ( $p < 0.05$ ).

**A) Correlaciones pH/Materia Seca y pH/ADIN PB**

Se encontró correlación negativa entre pH y Materia Seca en los silos de Pradera, y correlación positiva entre pH y ADIN Proteína en los silos de Sorgo-Maíz, datos que coinciden con los resultados obtenidos por Corengia y col. (2).

Los resultados de regresión obtenidos se presentan en el Cuadro N° 7 y gráficos N° 1 y N° 2.

Estos resultados permiten confirmar la hipótesis de que variaciones en el porcentaje de MS puedan afectar el pH, así como que el pH puede influir sobre la proporción final de Nitrógeno de Maillard.

Cuadro N° 6

**Resultados de los silos de Sorgo**

N° de muestras: 15

	Media	STD	C.V.
pH	4.18	0.51	12.21
M. Seca%	28.70	5.15	17.95
P.B.%	6.13	1.39	22.66
ADF%	39.81	5.76	14.47
ADIN%1	0.98	0.53	54.06
ADIN/P.B.%	18.35	15.72	85.65
Cenizas %	8.11	1.44	15.81
Calcio %	0.48	0.22	45.18
Fósforo %	0.11	0.04	32.94
ENL.Mc/K	1.35	0.10	7.38
CDMS%	57.89	4.49	7.75

Cuadro N° 7

**Correlaciones entre pH/MS y pH/ADINP**

Tipo de silo	r <sup>2</sup> pH/MS	p=	r <sup>2</sup> pH/ADINP	p=	Grados libertad
Pradera	0.3303	0.003	0.0256	0.231	19
Maíz	0.0043	0.289	0.0167	0.212	35
Sorgo	0.0754	0.894	0.0289	0.450	13
Sorgo-Maíz	0.0411	0.533	0.4409	0.003	14



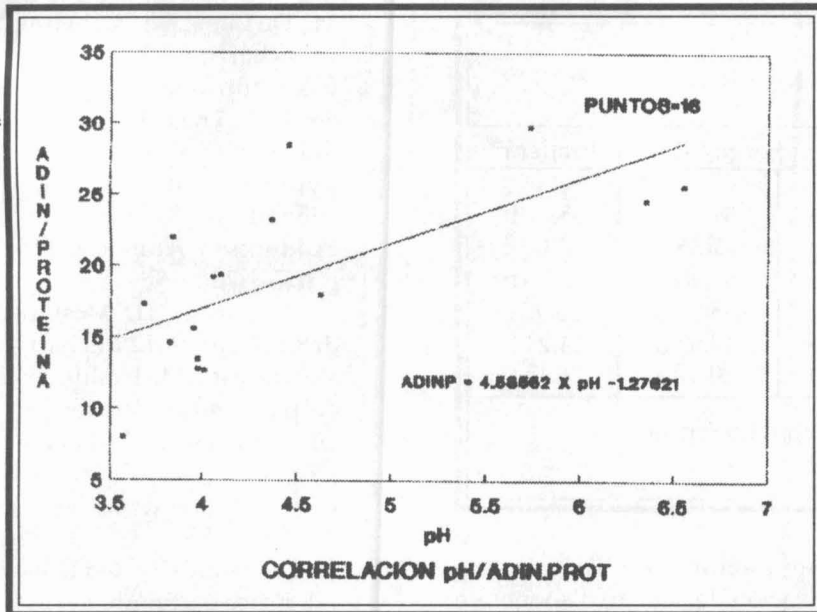


Fig. 1. Silos de Pradera

Son varios los factores que pueden modificar la calidad de un silo del punto de vista nutricional (15). Estos factores afectan diferentes parámetros que determinan dicha calidad. Se consideran los tenores de Proteína Bruta y contenido energético del ensilado, como los parámetros más importantes.

A través de los resultados obtenidos, se destacan en primer lugar, las diferencias encontradas en el tenor de Proteína Bruta en los silos de Maíz entre los dos años. Hay que recordar que los silos del año 1989, son el resultado de una cosecha luego de un período prolongado de sequía, condición que puede determinar un cambio en el aprovechamiento del nitrógeno por el forraje, modificando el tenor en Proteína del mismo.

En relación a los otros parámetros estudiados, si bien las diferencias no fueron significativas entre un año y otro, es interesante destacar los altos coeficientes de

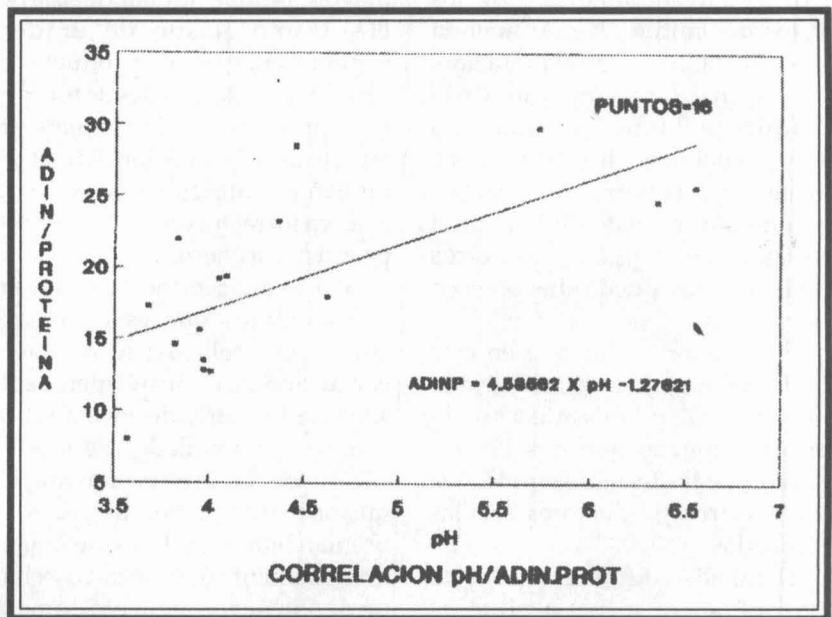


Fig. 2. Silos de Sorgo/Maíz

variación encontrados entre silos del mismo tipo.

C) Diferencias entre los distintos grupos de silos para los parámetros evaluados

En relación a los parámetros evaluados entre los silos, las diferencias encontradas se muestran

en el cuadro N° 8.

## CONCLUSIONES

Reafirmando conclusiones de trabajos nacionales anteriores, se recalca la diferencia existente entre los valores analíticos de los silos nacionales con los extranjeros, por lo que en el momento de balancear una dieta sería conveniente el uso de datos nacionales.

Aún más, debido a las variaciones encontradas entre años y fundamentalmente a los altos coeficientes de variación en los silos del mismo grupo, debe destacarse la importancia del análisis por parte de técnicos y productores de los

silos antes de su uso.

Con referencia a los silos de Maíz, Sorgo y Sorgo-Maíz analizados, sus valores son insuficientes como para ser empleados como alimento sin suplementación proteica en ganado lechero en épocas de carencia forrajera.

Cuadro N° 8

## Diferencias entre los silos

	Maíz	Sorgo	Sorgo/Maíz	Pradera
ADF%	32.25 a	39.81 b	39.70 b	45.11 b
ENLact Mc/K	1.48 a	1.35 b	1.35 b	1.00 c
CDMS %	63.78 a	57.89 b	57.98 b	53.76 b
P.B. %	6.77 a	6.13 ab	5.04 b	10.96 c
ADIN/PB%	9.96 a	18.35 b	19.07 b	24.24 b
Calcio %	0.58 a	0.48 a	0.47 a	1.43 b

Diferencias literales entre columnas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

Con respecto a la ventaja económica del uso de estos silos, va a depender en cada caso de los costos del cultivo, Kg de materia seca por Há, costos de elaboración, etc.. Consideramos que cada productor debe estimar la conveniencia o no de esta reserva y creemos que la forma más práctica es comparar el costo de la unidad proteica y/o energética con otros alimentos que pueda disponer en ese momento.

Es de hacer notar que en este tipo de silos no hemos encontrado en general problemas en la fermentación, lo que nos lleva a pensar que las técnicas empleadas por nuestros productores son las adecuadas.

Del análisis de los resultados de silos de Pradera, surge que si bien el tenor en proteína de los mismos es relativamente adecuado, el nivel energético es bajo. Pensamos que esto es consecuencia de una baja calidad de la pradera en el momento de su cosecha para ensilarla. En nuestra opinión es debido a que el productor opta por ensilar un forraje maduro ya que: a) al aumentar el contenido en Materia Seca, y bajar el de Proteína disminuye los riesgos de una mala

fermentación facilitando la realización del silo, b) disponer de mayor cantidad de materia seca por Há. Como el silo de Pradera generalmente es el producto de excedentes estacionales de forraje y no representa una inversión extra el costo de implantación del cultivo, opinamos que es un sistema de reserva forrajera económica para el productor lechero.

Por lo anteriormente expuesto, consideramos que es de interés continuar el estudio, pero encauzándolo exclusivamente a los silos de Pradera, de forma tal de estudiar posibilidades de modificación en la producción de los mismos, ya sea por métodos de premarchitado, aditivos, o evaluando el momento óptimo de cosecha a fin de obtener un alimento de mejor valor nutritivo.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Andriev, J.; Demarquilly, C.** Valeur nutritive des fourrages: Tables et prevision. Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, INRA-N° 70:61-73, 1987.
2. **Corengia, C.; D'Alessandro, J.; Repetto, J.L.; Hareau,**

**M.; De Lima, D.; Michelini, E.; Echarri, V.** Estudio del valor nutritivo de distintos ensilados en la alimentación del ganado lechero. 1ª Comunicación. In: Jornadas Científico Técnicas de Producción Animal, 1988, p.A53-A70.

3. **Corengia, C.; D'Alessandro, J.; Repetto, J.L.; Echarri, V.; Hareau, M.** Evaluación del parámetros nutricionales en ensilajes de la cuenca lechera. In: Congreso Panamericano de la Leche, 3º, 1989, p.55.
4. **Feed Industry Red Book.** Ed. Bruce W. Smith, 1991.
5. **Giger, S. et Pochet, S.** Méthodes d'estimation des constituents pariétaux dans les aliments destinés aux ruminants. Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, INRA N°70:49-60, 1987.
6. **Goering, K.K. and Van Soest, P.J.** Forage fiber analysis. Agricultural Handbook (379) Agr. Res. Serv. U.S.D.A. 1970.
7. **Harris, L.E.** Métodos para el análisis químico y la evaluación biológica de alimentos para animales. Center for Tropical Agriculture. Feed composition project. University of Florida, USA, 1970.
8. **Latin American Tables of feed composition.** University of Florida, 1972.
9. **Manual Tecator Kjeltec System.** 1979.
10. **Martin, N.P. and Linn, J.G.** Interpreting forage test results. St. Paul, Minnesota, University of Minnesota. Agricultural Extension Service. 1985, p.60-68.
11. **Mondino, M.; Bruno, O.;**

- Fernández, H.; Romero, L.; Gaggioti, M.** Conservación de forrajes. Informe de los resultados obtenidos en conservación de forrajes en la Estación Experimental Agropecuaria de Rafaela. Reunión Técnica para Profesionales de las Ciencias Agrarias. Rafaela, INTA, 1988.
12. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Sixth Revised Ed. Update 1989. Washington D.C., National Academy of Sciences, 1989.
13. **Obeid, J.A.; Prates Zago, C.; Gomide, J.A.** Qualidade e valor nutritivo de silagen consorciada de milho com soja anual. Rev. Soc. Bras. Zoot. 14(4): 439-446, 1985.
14. Official and tentative methods of American Oil Chemists Society. Method N° Ca 12-55. Third Ed. 1972.
15. **Pigurina, G.** Factores que afectan el valor nutritivo y la calidad de fermentación de ensilajes. In: Pasturas y Producción Animal en Areas de Ganadería Intensiva. INIA, 1991. Serie Técnica N° 15. P. 77-92.
16. **Pigurina, G.; Methol, M.** Tabla de contenido nutricional de pasturas y forrajes. In: Guía para la Alimentación de Rumiantes. Montevideo, Hemisferio Sur, INIA, 1991 Serie Técnica N° 5, p. 7-31.
17. **Repetto, J.L.; Corengia, C.; D'Alessandro, J.; Echarri, V.; Cajarville, C.; Hareau, M.** Comparación de resultados de silos de pradera y silos de maíz en dos años sucesivos. In: Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, 2°, Montevideo, 1991, p.166.
18. **Van Soest, P. J.** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds: III study of the effects of heating and drying on yield of fiber and lignin in forages. J. Assoc. Off. Agric. Chem. N°48: 785-790, 1965.
19. **Van Soest, P.J.; Robertson, J.B.** Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: Workshop on standartization of analytical techniques. Ottawa, 1979.
20. **Wernli, K.C.** La conservación de forrajes en producción lechera. Reunión Técnica para Profesionales de las Ciencias Agrarias. Rafaela, INTA, 1988.

Trabajo aprobado para su publicación: 19/7/93

**USE LA  
CABEZA.**



**USE IVOMEC**

**MSD AGVET**   
División de Merck Sharp & Dohme

**cibeles**   
12 de Diciembre 767  
Tels.: 201278 - 291001 - 206231

# Generación de marcadores macho específicos para la determinación de sexo bovino por PCR

Hirigoyen, D.\*; Bruzzoni Giovanelli, H.\*; Azambuja, C.\*\*; Stoll, M.\* (\*\*)

## RESUMEN

La determinación prenatal del sexo en las especies de interés pecuario, es una metodología de gran interés desde el punto de vista productivo. En este trabajo se utilizó el ADN de seis bovinos, raza Holando, para detectar marcadores macho específicos (sexado), con la técnica de amplificación de ADN in-vitro (PCR). De esta forma fue posible detectar secuencias específicas de sexo masculino, utilizando cantidades de muestras tan pequeñas como 5 pg de ADN. El método diagnóstico aplicado resultó ser específico, sensible, rápido y económico.

Palabras clave: Bovinos, determinación del sexo, amplificación de ADN, PCR.

## SUMMARY

The prenatal sex determination in farm animals species of interest, is an strategic goal from a productive point of view. In this work the DNA amplification in vitro technique (PCR) was used to detect male specific markers (sex marker), using the DNA of six Holstein breed bovines.

It was possible the detections of male markers DNA amplification using as little as 5 pg of DNA samples. The diagnostic method applied to bovine resulted specific, sensitive, rapid and economic.

Key Words: Cattle, DNA amplification, polymerase chain reaction, sex determination.

## INTRODUCCION

La determinación prenatal del sexo en los animales domésticos genera un importante impacto productivo. El valor económico de los animales de producción varía según sea su sexo (17). En la explotación vacuna, en determinadas circunstancias, es importante lograr una mayor descendencia de un determinado sexo. Por ejemplo, mayor número de hembras en la producción lechera y de machos en la producción de carne.

En la órbita de la industria frigorífica la aplicación de marcadores de sexo postnatal en bovinos (a partir de sangre o

músculo) cobra importancia, pues las canales de animales machos reciben mayor cotización en los mercados australianos.

Para investigar el sexo, existen en bovinos métodos inmunológicos (19), citogenéticos (13) y sondas de ADN (ácido desoxirribonucleico) (15) (8), que exhiben distintos grados de sensibilidad y repetibilidad.

Los mismos se basan en detectar la presencia del cromosoma Y, un segmento del mismo, o bien un producto de la expresión de sus genes.

Ultimamente la técnica de sexado se ha sumado al transplante de embriones donde cobra

relevancia su aplicación junto a la fertilización in-vitro y el clonado de embriones (17). Los métodos de sexado antes citados insumen mucho tiempo y presentan una serie de dificultades que pueden comprometer la viabilidad de los embriones preimplantados (17).

La técnica de amplificación de ADN in-vitro (PCR) (10) (18) permite realizar un rápido, simple y fiable diagnóstico de sexo en diferentes especies, amplificando secuencias macho específicas (2) (11) (12). Esta técnica permite copiar en forma exponencial segmentos predeterminados del ADN, a través de sucesivos ciclos térmicos.

En este trabajo se reporta la

\* División Citogenética. Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE).  
Avda. Italia 3318, Montevideo

\*\* Unidad de Biotecnología. Estación Experimental "Las Brujas" INIA, Canelones.



puesta a punto de la técnica de PCR a partir de sangre (postnatal), para la identificación de secuencias repetidas del brazo corto del cromosoma Y, propias del sexo masculino de Bovino (*Bos taurus*). Se describen los parámetros ensayados y las concentraciones decrecientes de ADN utilizadas con el propósito de estimar el grado de sensibilidad de la técnica. Se discuten elementos metodológicos y las variables a tener en cuenta en su aplicación.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención de muestras

Se trabajó con 6 bovinos adultos raza Holando, 3 de ellos hembras recién paridas y 3 machos que se utilizaban como dadores de semen.

A todos ellos se les extrajo 20 mililitros (ml) de sangre entera por punción de vena yugular, con

jeringa desechable con 1,5 mg de EDTA-Na/ml de sangre.

Las muestras colectadas fueron transportadas al laboratorio en conservadora isotérmica y mantenidas a 4°C hasta su procesamiento.

### Extracción de ADN

Cada sangre extraída fue mezclada con 9 volúmenes de Tampón de lisis (Sacarosa 0.32 M, Tris 10 mM, 5mM MgCl<sub>2</sub>, Tritón 100x 1%) y los núcleos recuperados centrifugando a 3000 rpm/10 min. Los precipitados fueron resuspendidos con 4,5 ml de tampón con 75 mM NaCl, 24 mM EDTA pH 8.0, (SE).

Se agregaron 250 microl de 10% Sodium-Duodecilo-Sulfato (SDS) y 100 microgr/ml de Proteinasa K, incubándose a 37°C por 120 min. Se mezclaron suavemente con 5 ml de Fenol saturado con 20 mM Tris pH= 8.0, se centrifugaron a 6000 rpm/10

min. recuperándose la fase acuosa, precipitándose el ADN con el agregado de 1/10 del volumen de acetato de Na (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto; y se mezclaron suavemente hasta que se visualizó el ADN.

El ADN se recogió con una varilla de vidrio, se enjuagó dos veces en alcohol 70%, se dejó secar al aire, y se resuspendió en 1 ml de tampón con 10 mM Tris, pH= 8.0, 1 mM EDTA (TE).

Se evaluó la concentración del ADN por medidas de absorción a una longitud de onda de A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> con un espectofotómetro DMS 200 VARIAN.

### Amplificación del ADN in vitro

Se seleccionaron del gen macho específico, dos secuencias repetidas del brazo corto del cromosoma Y (2) (14) que fueron fabricados por OPERON

**SAGUAYPICIDA, LOMBRICIDA, OESTRICIDA**

# Revanmix

**Oral e  
inyectable**

**CLOSANTEL + LEVAMISOL**

LABORATORIO  
*Revan*

**GUAYAQUI 3095 MONTEVIDEO**



**LE OFRECEMOS  
TANTO CONFORT  
COMO EL MEJOR,  
NOS DISTINGUE UNA  
SONRISA**

- \* TV color satelital
- \* Circuito cerrado de video
- \* Video Cassete individual
- \* Dos antenas parabólicas
  - \* Frigobar
  - \* DDI-DDN desde la habitación
- \* Teléfono en el baño
  - \* Secador de pelo
- \* Cofre de seguridad en las habitaciones
- \* Room Service las 24 horas
  - \* Desayuno bufet
  - \* Snack Bar
  - \* Cafetería
- \* Sala de reuniones
- \* Busines facilities
  - \* Baby sitters
- \* Aire acondicionado
- \* Calefacción central
- \* Estacionamiento propio
  - \* Equipos de energía propios

**PARA EMPRESAS  
APERTURA DE CUENTA  
CORRIENTE INMEDIATA.  
POR CONSULTAS  
DIRIGIRSE A NUESTRO  
DEPARTAMENTO DE  
MARKETING**

**PARAGUAY 1286  
TEL.: 92 00 46  
FAX: 92 37 92  
C.P. 11100  
MONTEVIDEO  
URUGUAY**

Technologies Inc. El par de oligonucleótidos cuyas secuencias figuran en la tabla 1, flanquean un fragmento de 307 pares de bases (pb) del gen. Oligonucleótidos específicos para el gen de Kappa-caseína que flanquean un fragmento de 350 pb (6)(7)(9), fueron utilizados para estimar el tamaño de las bandas de sexado y como controles de amplificación.

ciclador termoregulable marca Biometra con tres bloques autónomos, de 20 pocillos cada uno. El perfil termal incluyó 40 ciclos de desnaturalización, hibridización y extensión que prolongaron la reacción por un lapso de 3 hs. 20 min. (Cuadro 2).

*CORRIDA  
ELECTROFORETICA*

Cuadro N°1

**Secuencias de ADN específicos del cromosoma Y bovino, y pares de oligonucleótidos para la determinación de sexo**

Secuencia	Oligonucleótidos	Longitud del frag. Amplificado
BRY.1 (Matthews 1990)	GGATCCGAGACACAGAACAGGCTGC TATCCTACCTACCTAATCGAACTAGTT	307 PB

*ENSAYO*

Se trabajó con 100 nanogramos (ng) de ADN correspondientes a cada animal para realizar la amplificación en un volumen final de 100 µl. La reacción se efectuó en tubos de microcentrífuga de polipropileno de 500 µl de volumen total conteniendo cada uno: 10 µl de tampón 10 X de PCR (GeneAmp, Perkin Elmer), 0.1 % Gelatina, 200 M de cada dNTP (dATP), dCTP, dTTP y dGTP), 20 pMolar (pM) de cada oligonucleótido, 1.5 unidades de Enzima de Amplitaq ADN Polimerasa (Perkin-Elmer/Cetus), y agua estéril hasta completar.

Se efectuaron ensayos para estimar la sensibilidad de la técnica con concentraciones decrecientes de ADN, 50 ng, 5 ng, 50 picogramos (pg) y 5pg.

Las muestras se amplificaron en un

Los fragmentos de ADN se separaron por su tamaño, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

Se utilizó agarosa ultra pura (Gibco BRL) en tampón Tris-Acetato (TAE) 0.04 M pH 8.0, 1 mM EDTA.

La corrida se realizó en cuba horizontal (modelo H3 Gibco BRL), con tampón TAE, a un voltaje de 2.5V/cm de distancia entre los electrodos con una fuente de poder de 230 V, 0.7 Amp y 50/60 Hz marca Polisistem, durante 90 min.

Los productos de amplificación

Cuadro N°2

**Perfil termal de la reacción**

1. Ciclo de: 94°C/180 seg.
2. 40 ciclos de: 56°C/60 seg.  
72°C/60 seg  
94°C/60 seg
3. Ciclo de: 72°C/300 seg

se visualizaron por tinción del gel con una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (Sigma Chem. Company) 0.5 mg/ml durante 20 min. y posterior observación bajo luz ultravioleta en un transiluminador con lámpara de 312 nm, (marca Bioblock Scientific).

## RESULTADOS

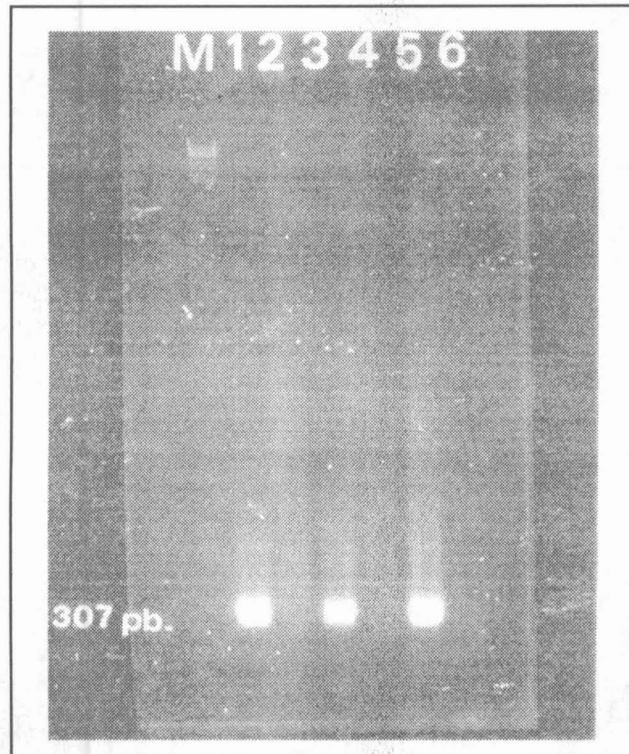
Los productos de amplificación del segmento del gen macho específicos obtenidos en las condiciones descritas, tienen pesos moleculares que coinciden con los esperados.

El tamaño de las bandas es de aproximadamente 307 pb (Figura 2).

Se observaron bandas en todas las muestras provenientes de los individuos fenotípicamente masculinos (Figura 1), no obteniéndose amplificación en las muestras correspondientes a las hembras.

El análisis insumió un día desde la obtención de las muestras hasta el diagnóstico correspondiente al sexo de los 6 animales analizados.

Los controles de amplificación, en los que se utilizaron oligonucleótidos para el gen de Kappa-caseína, mostraron la aparición de una banda del tamaño esperado (350 pb) en todos los individuos analizados (6) (7). En los controles negativos (sin ADN) no se observó la presencia de ninguna banda, confirmando la ausencia de amplificación



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de muestras de ADN bovino amplificado in-vitro.

**Pocillo M-** Marcador de peso molecular patrón (bacteriófago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III)

**Pocillo 1, 2 y 5-** Muestra con 5 ng de ADN de macho en presencia de oligonucleótidos de sexado (se ve banda de 307 pb).

**Pocillo 2 y 4-** Muestra con 5 ng de ADN de hembra en presencia de oligonucleótidos de sexado (no se ve ninguna banda).

**Pocillo 6 -** Muestra sin ADN en presencia de oligonucleótidos de sexado, control de inespecificidad (no se ve ninguna banda).

inespecífica (Figuras 1,2 y 3).

Las mezclas de reacción y el desarrollo del perfil termal insumieron 5 horas de las cuales 210 min. corresponden al proceso de amplificación y 90 min. a la corrida electroforética.

Las bandas se observan por la fluorescencia del BrEt, no necesitándose marcaje isotópico.

Los ensayos realizados con concentraciones decrecientes del ADN molde, detectaron

amplificaciones hasta un nivel tan bajo como 5 pg. (Figura 2).

## DISCUSION

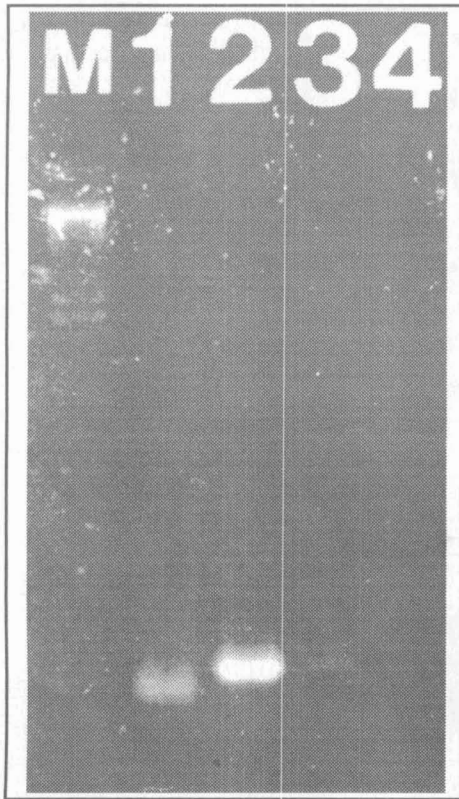
En este trabajo se evidencia la factibilidad y eficacia del uso de una técnica molecular, altamente específica para determinar el sexo masculino de los bovinos en Uruguay.

Cuando pusimos a punto la técnica inicialmente nos inclinamos a efectuar una detección postnatal, por los riesgos de pérdida embrionaria que la manipulación trae aparejados. Posteriormente seguimos ensayando el proceso a nivel de embriones con la finalidad de mejorar el método; cabe destacar que casi por la misma fecha otro grupo de Facultad de Veterinaria del Uruguay, trabajando en coordinación con un equipo de investigadores brasileños, comunica la obtención exitosa de embriones con sexo conocido por PCR (16).

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos coinciden con reportes efectuados por otros investigadores (11) (12), que utilizaron la técnica de PCR, para amplificar específicamente secuencias repetidas del brazo corto del cromosoma Y.

La utilización de un par de oligonucleótidos que reconocen las secuencias específicas de este cromosoma, nos permite lograr amplificaciones solamente en el ADN proveniente de los machos (Figura 1).





**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de muestras de ADN bovino amplificado in-vitro.

Pocillo M - Marcador de peso molecular patrón (Bacteriófago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III).

Pocillo 1 - Muestra con 5 ng de ADN macho en presencia de oligonucleótidos de sexado (se ve banda de 307 pb).

Pocillo 2 - Muestra con 5 ng de ADN de macho en presencia de oligonucleótidos de Kappa-caseína (se ve banda de 350 pb).

Pocillo 3 - Muestra con 50 pg de ADN de macho en presencia de oligonucleótidos de Kappa-caseína (se ve banda de 350 pb).

Pocillo 4 - Muestra sin ADN en presencia de oligonucleótidos de sexado, control de inespecificidad (no se ve ninguna banda).

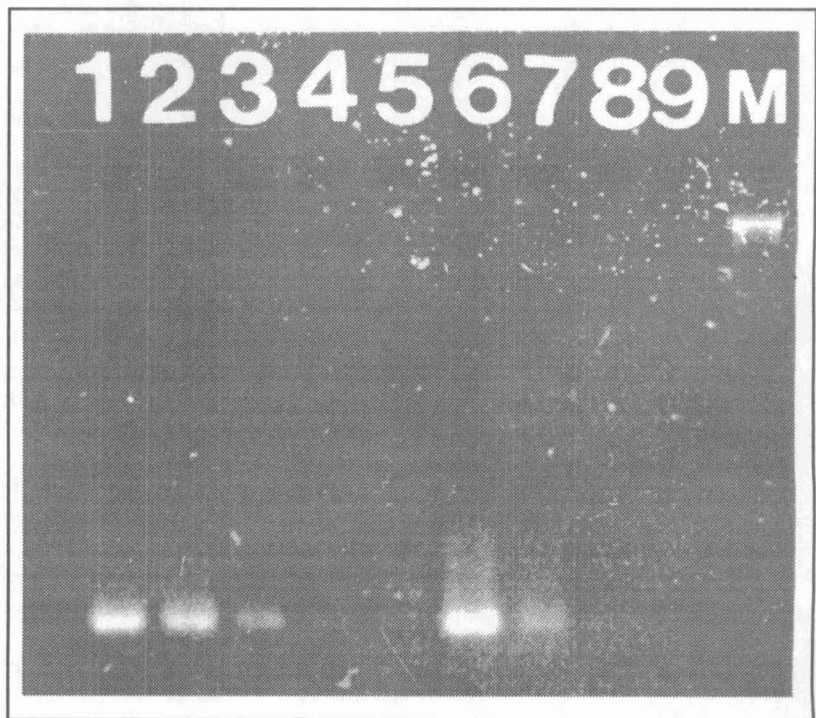
A la luz de los resultados obtenidos, la caracterización de sexo por este procedimiento es rápida, sensible y fiable.

El producto de amplificación se evidenció con un intercalante fluorescente que sustituye los radioisótopos, permitiendo disminuir costos, brindar mayor seguridad y agilidad al operario.

Los ensayos de sensibilidad que realizamos evidenciaron amplificaciones a partir de muestras de ADN tan pequeñas

como 5 pg. Si tenemos en cuenta que una célula de mamífero posee aproximadamente 6 pg de ADN, podríamos suponer que con esta técnica es posible efectuar un diagnóstico con muy pocas células.

La ocurrencia de falsos negativos ha sido reportado por complicaciones metodológicas, pudiendo ser superado con la incorporación de un segundo par de oligonucleótidos que amplifiquen secuencias repetidas autosómicas (12). Otros autores



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de muestras de ADN bovino amplificado in-vitro. Ensayo de sensibilidad.

Pocillo M - Marcador de peso molecular patrón (Bacteriófago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III).

Pocillo 1, 2, 3 y 4 - Muestras con 50 ng, 5 ng, 50 pg y 5 pg respectivamente de ADN de macho, en presencia de oligonucleótidos de sexado (se ven bandas de 307 pb).

Pocillo 5 - Muestra sin ADN, en presencia de oligonucleótidos de sexado, "control de inespecificidad" (no se ve ninguna banda).

Pocillo 6, 7, 8 y 9 - Muestras con 50 ng, 5 ng, 50 pg y 5 pg respectivamente de ADN de otro macho, en presencia de oligonucleótidos de sexado (se ven bandas de 307 pb).

Pocillo 4 - Muestra sin ADN en presencia de oligonucleótidos de sexado, control de inespecificidad (no se ve ninguna banda).



evitan el problema con la determinación de sexo de muestras de ADN de humanos, bovinos, ovejas y cabra, con un solo par de oligonucleótidos universal que amplifica un fragmento (tanto en macho como en hembra) (1), que se digiere con enzimas de restricción.

En nuestros ensayos la inclusión de la amplificación del gen de Kappa-caseína, facilitó descartar la posibilidad de obtener falsos negativos. De todas maneras es necesario ajustar el método y en tal sentido, estamos ensayando oligonucleótidos que amplifican ADN ribosomal, que esperamos nos sirvan como controles de amplificación.

El método cobra importancia en el área de reproducción, con el trasplante de embriones, donde estos pueden ser obtenidos por colectas uterinas de vacas donadoras o por fertilización in

vitro, biopsiados en el estado de blastocito, sexados por PCR e implantados, manteniendo su viabilidad (11) (16).

## CONCLUSIONES

Creemos que el PCR ofrece ventajas frente a los otros métodos de sexado, por la especificidad, sensibilidad y rapidez con que se efectúa (5 horas).

El método combinado con otras tecnologías como la micro-manipulación de embriones le daría un fuerte impulso en nuestro país al mejoramiento zootécnico, a la comercialización y al desarrollo de embriones sexados y caracterizados genotípicamente.

Por otro lado, la utilización de marcadores de sexo en los bovinos podría cobrar la importancia que posee, por ejemplo en Australia, donde los Servicios cuarentenarios

de industria animal efectúan la técnica, para certificar la carne provenientes de animales machos, debido a su mayor cotización.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aasen, E. and Medrano, J.F. (1990) Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/Technology* 8:1279-1281.
2. Bondioli, K.R.; Ellis, S.B.; Pryor, J.H.; Williams, M.W. et Harpold, M.M. (1989) The use of male specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 31:95-103.
3. Hardy, K.; Martin, K.L.; Leese, H.J.; Wiston, R.M.L. and Hardyside, A.M. (1990)

# CON

# CIENCIA

## EN LA SANIDAD ANIMAL

LABORATORIO CIENCIA  
"EL DE LAS GRANDES MARCAS"

# DERRAMIN

GARRAPATICIDA INSECTICIDA

LUIS A. DE HERRERA 4009 - TELS.: 20 86 74 - 29 69 11

Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. Human Reprod. 5: 708-714.

4. **Hirigoyen, D.; Bruzzoni Giovanelli, H.; Azambuja, C. y Stoll, M.** (1991) Aplicaciones del PCR al mejoramiento bovino. In: Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, 6<sup>a</sup>... Piriápolis.
5. --- (1992) Variantes de Kappa-caseína en leche. Rev. Actual.Téc. Agropecu.
6. --- (1992) Análisis de variantes alélicas de Kappa-caseína en bovinos de leche. In: Congreso Latinoamericano de Genética, 10o., Río de Janeiro, Brasil.
7. **Leonard, M.; Kirszenbaum, M.; Cotinot, C.; Chesne, P.; Heyman, Y.; Stinnakre, M.G.; Bishop, C.;**

**Delouis, C.; Vaiman, M. and Fellous, M.** (1987) Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. Theriogenology 27:248.

8. **Medrano, J.F. and Cordova, E.A.** (1990). Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. Bio/Technology 8:144-146.
9. **Mullis, K.B. and Falloona F.** (1987) Specifics synthesis of DNA in vitro via polimerasa catalized chain reaction. Methods Enzimol. 155: 335-350.
10. **Nihart, M.** (1991) Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquees: bisection et sexage. Rec. Med. Vet. 167 (3/4): 261-290.
11. **Peura, T.; Hyttinen, J.M.; Turunen, M. and Janne, J.** (1991) A reliable sex

determination assay for bovine preimplantation embryos using the polyimere chain reaction. Theriogenology 35:547-555.

12. **Picard, L.; King, W.A. et Betteridge, K.J.** (1987) Production of sexed calves from frozen thamed embryos. Vet. Rec. 114:240-243.
13. **Plucienniczak, A.; Skowronski, J. and Joworski, T.** (1982) Nucleotidique sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. J.Mol. Biol. 158:293-304.
14. **Popescu, C.P.; Cotinot, C.; Boshier, J. et Kirszenbaum, M.** (1988) Chromosomal localization of a bovine male specific probe. Ann. Genet. 31:39-42.
15. **Postiglioni, A.; Larocca, C.; López, R.F.F.; Fernández, A.; González, A.; Llambí, S. y Rodríguez, J.** (1991) Obtención de una preñez con embriones de sexo conocido. Método de PCR. In: Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, 2a. Montevideo.
16. **Rajnachapel-Messaï, J.** (1991) Reproduction animale: Les technologies de L'embryon. Biofutur 27-37.
17. **Saiki, R.K.; Scharf, S.; Falloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A. and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sick cell anaemia. Science 230:1350-1354.
18. **Wachte, S.S.; Nakamura, D.; Watchel, G.; Felton, W.; Kent, M. et Jaswaney, V.** (1988) Sex selection with monoclonal H-Y antibody. Fertil. Esteril. 50:355-360.

Aprobado para su publicación el 3/5/94.

casa del  
criador



DE  
TODO  
PARA  
EL CRIADOR

- JERINGAS
- DOSIFICADORES
- ESQUILA
- INSEMINACION

- EQUIPOS
- INSTRUMENTOS
- HERRAMIENTAS

DISTRIBUIDOR DE LOS AFAMADOS PRODUCTOS "WALMUR"  
GRAL. FLORES 3269 CASI L A DE HERREHA  
TELS 23 60 13 20 80 40



# Inseminación artificial a tiempo fijo en cabras criollas

Romano, J.E.\*; Ayala, M.\*\*; Lago, I.\*; Cuñarro, B.\*\*

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la fertilidad en cabras criollas luego de la inseminación artificial a tiempo fijo con semen refrigerado.

Doce cabras criollas fueron divididas al azar en 2 grupos iguales de 6 animales. El primer grupo se inseminó a 48 horas del retiro de las esponjas intravaginales, y el segundo grupo se inseminó a las 60 horas. El celo se sincronizó mediante el uso de esponjas intravaginales de acetato de fluorogestona (FGA, 40 mg) durante 12 días más 200 IU de gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG) por vía intramuscular en el momento del retiro de las esponjas. Una sola inseminación por vía cervical se realizó a cada cabra. El semen provino de un mismo eyaculado mantenido refrigerado a 4-5°C en pajuelas de 0,25 ml. Las cabras de cada grupo se encontraban en celo en el momento de su inseminación. La parición fue de 60% en el grupo de 48 horas y 50% en el grupo de 60 horas. Se concluye que la inseminación artificial a tiempo fijo con semen refrigerado presentó buenos resultados.

Palabras clave: Inseminación artificial, cabras, semen congelado, fertilidad.

## SUMMARY

The objective was to determinate the fertility in creole goats after artificial insemination at fixed time by using refrigerated semen.

Twelve creole female goats were divided at random in 2 groups of 6 animals each. The first group was inseminated 48 hours and the second 60 hours after pessarie removal. Estrus was synchronized by leaving fluorogestone acetate intravaginal pessaries (FGA, 40 mg) during 12 days and by injecting with 200 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) by i.m. route at the pessarie removal. Each doe was inseminated only once cervical route. Semen was obtained from one refrigerated (4-5°C) ejaculated stored in 0.25 ml french straw. Goats were in estrus at artificial insemination time. The kidding rate was 60% for 48 hours and 50% for group 60 hours.

It is concluded that artificial insemination at fixed time at 48 or 60 hours with refrigerated semen was good.

Key words: Artificial insemination, goats, frozen semen, fertility.

## INTRODUCCION

El empleo de la inseminación artificial (I.A.) es un instrumento tecnológico que permite un rápido y extenso uso de reproductores machos probados (4).

El servicio prestado por machos cabríos comunitarios se vería facilitado por el uso de dicha técnica con semen refrigerado, y muy

especialmente congelado que permite una mayor difusión independiente del tiempo y espacio (7).

La sincronización del celo, es otro instrumento tecnológico para ser utilizado en programas de cría controlada, que permite agrupar los trabajos de detección de celo, consecuente inseminación y finalmente parición (10). El uso

concomitante de la I.A. a tiempo fijo, incrementaría aún más el uso racional del tiempo, en condiciones tales como: 1. Granjeros que están abocados a otras tareas agrícolas facilitando la programación con antelación suficiente del uso de un mismo reproductor. 2. La detección del celo sin macho, normalmente es una posible causa de error. La I.A. a tiempo fijo ofrece la posibilidad

\* Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria Lasplacas 1550- 11600 Montevideo, Uruguay

\*\* Zoológico Municipal. Intendencia Municipal de Montevideo. Rivera 3245.11600 Montevideo, Uruguay

de eliminar dicha actividad, muy especialmente a pequeños productores que carecen de animales detectores de celo. 3. En animales de zoológico en los cuales por sus condiciones de habitat y manejo se verían favorecidos por la disminución de las frecuentes detecciones de celo, y paralelamente de los factores de stress.

El objetivo fue estudiar el efecto de la inseminación artificial a tiempo fijo con semen refrigerado a 48 y/o 60 horas del retiro de las esponjas intravaginales con progestágeno y PMSG en cabras criollas.

#### MATERIALES Y METODOS

El presente experimento se realizó durante el otoño de 1991 en el Zoológico Municipal de Montevideo.

Los animales utilizados fueron 12 cabras de raza criolla. Los animales pesaban entre 24 y 32 kg. A cada cabra se realizó un examen clínico general y una inspección vaginal. La profilaxis pre-ensayo consistió en administrar un antiparasitario externo pour-on (Cipermetrin: 5 ml/animal de solución al 6%), un antiparasitario interno (levamisol: 10 mg/kg por vía subcutánea y las pezuñas se recortaron. Cada hembra recibió luego de 10 días 62.5 microgramos de cloprostenol por vía intramuscular. Se alimentaron con heno de alfalfa, concentrado balanceado (300 g/animal/día), estando una mezcla de sal mineral y agua a libre disposición de los

animales.

Las cabras fueron divididas al azar en 2 grupos de 6 animales. El primer grupo para ser inseminado a las 48 horas del retiro de las esponjas y el segundo para ser inseminado a las 60 hs del retiro de las esponjas. El celo se sincronizó mediante el uso de esponjas intravaginales de acetato de fluorgestona (FGA, 40 mg) durante 12 días más 200 IU de gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG) administrada por vía intramuscular al retiro de las esponjas.

Un retajo de 3 años se utilizó como animal detector de celo. Se electroeyaculó en 2 diferentes momentos para comprobar la ausencia de espermatozoides en su líquido seminal. Se colocó pintura en su pecho una vez al día permaneciendo en forma continua con las hembras, luego del retiro de las esponjas vaginales. Una cabra con pintura en su grupa claramente definida fue considerada en celo. El celo se detectó a las 24, 48 y 60 horas del retiro de las esponjas.

Un macho cabrío cruza Pardo Alpina-Toggenburg de 3 años con historia de alta fertilidad se examinó por salud potencial reproductiva, dando como resultado ser un reproductor satisfactorio. El semen se obtuvo por electroeyaculación. Las siguientes características del eyaculado fueron determinadas: volumen inicial, % de espermatozoides móviles, movimiento individual, concentración y pH. El volumen inicial fue evaluado en el mismo tubo de colección

graduado en rangos de 0,1 ml. El % de espermatozoides móviles y el movimiento individual fue determinado en microscopio fotónico a por 400 con el condensador bajo, con el semen diluido 1/10 en solución salina tamponada entre portaobjetos y cubreobjetos.

La concentración de espermatozoides fue calculada en cámara de Neubauer con semen diluido 1:200 en solución salina al 3%. El pH fue determinado mediante papel indicador de rango de 6,4 a 7,8. Luego de superar los requisitos mínimos de aceptación, fue diluido en leche descremada termorizada más antibióticos (1000 IU de penicilina G potásica y 1000 microgramos de sulfato de estreptomina por ml. de diluyente). Se diluyó en proporción 1:1, se envasó en pajuelas de 0,25 ml, se refrigeró a 4-5°C en 2 horas, manteniéndose en esa temperatura hasta su utilización. Un mismo eyaculado se usó para inseminar todas las cabras. Cada cabra se inseminó con una pajuela vía cervical. El semen fue obtenido 5 horas antes de la primera inseminación a una distancia de 30 km del Zoológico Municipal.

Los parámetros controlados fueron los siguientes: número de hembras en celo, número de paridas, número de crías y largo de gestación.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados son presentados en la Tabla 1. Las características del

a. Derramin, Química Brouwer S.R.L. Buenos Aires, Argentina.

b. Ripercol L. Inyectable. Laboratorios Instituto Veterinario Uruguayo Montevideo - Uruguay

c. Estrumate. Coopers Animal Health Ltd. Berhamsted - England.

d. Chronogest. Intervet International B.V. Boxmeer - Holland

e. Folligon. Intervet International B.V. Boxmeer - Holland



Cuadro 1

Datos del celo, Parición, N° de crías y largo de Gestación

Animal		En celo *			Parición	N° de crías	Largo de Gestación (días)
		24	48	60			
48 horas	A	-	+	+	-	-	-
	B	+	+	-	+	2	148
	I	+	+	-	+	2	147
	F	+	+	-	-	-	-
60 horas	H	+	+	-	+	2	149
	D	-	+	+	+	2	147
	C	-	+	+	-	-	-
	E	+	+	+	+	1	146
	G	-	+	+	-	-	-

\* Luego del retiro de las esponjas

eyaculado fueron las siguientes: volumen: 3,5 ml, % de espermatozoides móviles: 80%, movimiento individual: 3,5, concentración: 1360 millones de espermatozoides/ml, pH: 7.2. El número de espermatozoides utilizados por dosis inseminante fue de 170 millones totales, valor que se encuentra dentro de las cifras utilizadas en otros ensayos, suficientes para lograr preñez (4,6) Un factor a destacar fue el uso del mismo reproductor y de un solo eyaculado para inseminar todas las hembras, lo que anula la variación debido a dichos efectos (9).

Tres cabras presentaron inconvenientes en el retiro de sus esponjas: 1 perdió su esponja y 2 presentaron adherencias vaginales con hemorragia, no siendo incluidas en el ensayo, quedando finalmente 5 y 4 animales para los grupos 48 y 60 horas, respectivamente. Todos los animales integrantes del ensayo

presentaron celo dentro de las 48 horas luego del retiro de las esponjas. Cada cabra se encontró en celo en el momento de su respectiva inseminación artificial. El porcentaje de cabras que parieron es comparable con el de otras publicaciones (4,6).

La inseminación artificial a tiempo fijo en cabras recomienda 2 inseminaciones a diferentes tiempos como: 30 y 48 horas (3), 31 y 55 horas (5), 55 y 79 horas (5), 36 y 60 horas (4) y 36 y 48 horas (4). En cambio para una sola inseminación se recomienda a las 42 ± 2 horas y 45 ± 2 horas para cabras Alpina y Saanen, respectivamente (6). En nuestro caso, en el grupo de 48 horas, al momento de su inseminación se encuentra casi dentro de los valores sugeridos para una sola inseminación y coincidente para la 2ª dosis de algunos de los esquemas propuestos (3,4,5). En cambio el grupo de 60 horas, al

momento de su inseminación se encuentra fuera del momento recomendado para 1 sola dosis y de acuerdo con algunos de los esquemas mencionados con el uso de doble inseminación (3,4,5). Este último grupo abre la posibilidad de reevaluar los valores expuestos, o estudiar si es debido a una variación de la raza caprina utilizada, o a la interferencia de ciertos factores ambientales. El momento óptimo de la I.A. con respecto a la ovulación, es un punto de importancia fundamental para obtener la máxima fertilidad.

Todas las cabras parieron 2 crías, salvo una que parió 1 cría, lo que da una media de 1,8 crías por hembra parida. La hormona PMMSG que tiene acción predominantemente folículo estimulante sobre el ovario, es usada en la práctica en pequeños ruminantes hasta 600 IU por animal para mejorar el agrupamiento de celos luego del uso concomitante con progestágenos (5). Otra indicación es para provocar superovulación cuando es administrada en dosis iguales o superiores a 1000 IU en programas de transferencia de embriones (2). En el presente ensayo fue utilizada en dosis inferiores a la recomendada para sincronizar el celo. El número de crías/cabra muestra que la raza criolla es posiblemente pluripara genéticamente, si bien para determinar esto, se hubiera necesitado un grupo control (esponja vaginal con progestágeno sin PMMSG), el cual no fue objeto del presente estudio. El largo de gestación fue de 147.4 ± 1.1 días (media ± SD) duración que es similar a la presentada para la raza Nubia pero diferente a las razas Saanen y Alpina (1,8).

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que la I.A a tiempo fijo con semen refrigerado a las 48 y/o 60 horas del retiro de las esponjas en el celo post-sincronización de FGA y PMS presentó buen resultado. Ulteriores ensayos que involucren un gran número de cabras son requeridos para confirmar o rectificar los resultados encontrados, con la finalidad de establecer óptimos esquemas de sincronización del celo e inseminación artificial.

REFERENCIAS  
BIBLIOGRAFICAS

1. Agrawal, K.P.; Mongha, L.V. and Bhattacharyya, J. Collection and transfer of embryo in goats: surgical method. Indian Vet. J. 59: 298-

303, 1982.

2. Armstrong, D.T. and Evans, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. Theriogenology 19: 31-42, 1983.

3. Britt, J.H. Induction and synchronization of ovulation.

In: Hafez, E.S.E. (ed.) Reproduction in Farm Animals. Philadelphia, Lea & Febiger, 1987, p.507-516.

4. Corteel, J.M. L'insemination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. World Rev. Anim. Prod. 9: 73-98, 1973.

5. Corteel, J.M. The use of progestagen to control the oestrus cycle of the dairy goat. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 15: 353-363, 1975.

6. Corteel, J.M. and Leboeuf, B. Evolution tecnico-économique de l'insemination artificielle caprine. El & Ins. 237: 3-17, 1990.

7. Hafez, E.S.E. Artificial insemination. In: Hafez, E.S.E. (ed) Reproduction in Farm Animals. Philadelphia, Lea & Febiger, 1987, p.481-506.

8. Peaker, M. Gestation Period and litter size in the goat. Br. Vet. J. 134: 379-383, 1978.

9. Seidel, G.E. and Foote, R.H. Variance components of semen criteria from bulls ejaculated frequently and their use in experimental design. J. Dairy Sci. 56: 399-405, 1973.

10. Thimonier, J. Practical uses of Prostaglandins in Sheep and Goats. Acta Vet. Scand. Suppl. 77: 193-208, 1981.

AGRADECIMIENTOS

Al Ayudante Técnico Alfredo Troncoso y al personal del Zoológico Municipal de Montevideo que colaboró en el presente experimento.

Aprobado para su publicación  
15/12/93

**casa del criador**

**TIJERA DESVASADORA**

TECNOLOGIA ALEMANA

- MAS LIVIANA
- MAS FUERTE

ACERO DE UNA PIEZA. SE COMPRA UNA SOLA VEZ. NO SE AFILA NUNCA.

**RENETAS PARA CASCOS**

- DE ACERO • MANGO DE MADERA • 5 MODELOS

DISTRIBUIDOR DE LOS AFAMADOS PRODUCTOS "WALMUR"

GRAL. FLORES 3269 CASI L.A. DE HERRERA  
TELS. 23.60.13 / 20.80.40

# Primera obtención de dos preñeces en bovinos por embriones producidos in vitro en el Uruguay

Larocca, C.\*; Kmaid, S.\*; Romano, J.E.\*\*; Calvo, J.\*\*\*; Vigueira, M.\*\*\*; Dochi, O.\*\*\*\*

## RESUMEN

En el otoño de 1993, en el Laboratorio de Transplante de Embriones y Biotécnicas de la Facultad de Veterinaria se efectuó un ensayo sobre producción in vitro de embriones bovinos. De 15 embriones al estadio de blastocito, 13 fueron transferidos por vía no quirúrgica y 2 por vía quirúrgica. A partir de los 31 días de su implante se realiza ultrasonografía por vía rectal y posteriormente palpación rectal. Dos preñeces fueron confirmadas correspondiente una para cada grupo.

Palabras clave: Bovinos, transferencia de embriones, cultivo in vitro, cultivo de embriones, preñez.

## SUMMARY

During fall 1993 at the Laboratorio de Transplante de Embriones y Biotécnicas de la Facultad de Veterinaria an in vitro cattle embryo production trial was done, of 15 blastocyst embryos 13 were transferred by non-surgical method and 2 by surgical method. At day 31 of transfer a rectal ultrasonographic pregnancy diagnosis was done and later rectal palpation, was performed finding 2 pregnancies, each one corresponding at each group.

Key words: cattle, embryo transfer, in vitro culture, embryo culture, pregnancy.

## INTRODUCCION

La selección y mejoramiento genético de los rodeos bovinos se ha basado en gran medida en la inseminación artificial (IA) (2). La transferencia de embriones es otra de las técnicas en reproducción animal que incrementa el número de crías de una hembra (5). Por último, el desarrollo de las tecnologías de la reproducción in vitro, como: maduración de ovocitos, capacitación, fertilización y cultivo de embriones creó nuevas posibilidades para su utilización en bovinos (1). En particular, estas

tecnologías pueden representar la última oportunidad de obtener embriones de vacas de alto valor productivo que debido a patoogías del tracto reproductivo así como enfermedades sistémicas terminales impidan producir embriones viables (3).

El objetivo de la presente comunicación es describir la primera obtención de 2 preñeces en bovinos por embriones producidos in vitro en el Uruguay.

## MATERIALES Y METODOS

Los ovarios fueron colectados

de vacas provenientes de un frigorífico local y transportados al laboratorio en solución salina isotónica estéril más antibióticos a 30-35°C dentro de las 3 horas de extraídos. Los folículos de 2-5 mm de diámetro fueron aspirados con aguja 18 G conectada a una jeringa de 5 ml. Los ovocitos utilizados fueron los que contenían cumulus completo y compacto. El líquido de aspiración y lavado fue fosfato buffer salino (PBS) con glucosa y piruvato de Na más 1% de suero de ternero recién nacido (STRN). Los ovocitos se maduraron en medio de cultivo 199 con 1% de STRN

\* Departamento de Reproducción \*\* Departamento de Fisiología

\*\*\* Departamento de Morfología y Desarrollo Facultad de Veterinaria Lasplacés 1550 11600 Montevideo. Uruguay

\*\*\*\* National Livestock Breeding Center Nishi-Shirakawa-Gun. Kukushima-Ken 961, Japan

Financiado por C.S.I.C. U.R.O.U.

durante 22-24 horas, en gotas de 500 microl conteniendo 70 a 100 ovocitos y recubiertos por aceite de parafina estéril en una estufa a 38.5°C con 99% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

El semen provino de un eyaculado de un toro de probada fertilidad envasado en pajuelas de 0.5 ml. El semen se descongeló a 37°C durante 20 segundos y se diluyó 2 veces en medio BO modificado y se concentró por centrifugación a 500 g durante 5 minutos cada vez. Se ajustó a una concentración de 12.5 millones de espermatozoides/ml con BO medio con albúmina sérica bovina. Se prepararon gotas de 100 microl de semen a las que se transfirió 20-25 ovocitos y se cultivó durante 5 horas. Luego de la inseminación los ovocitos fueron transferidos al medio de desarrollo Hepes-TCM 199 suplementado con 10% de STRN con antibióticos. El medio fue reemplazado cada 48 horas. Se efectuaron observaciones a las 48 horas de la inseminación y luego cada 24 horas hasta el día 6 a 9 por

intermedio de una lupa estero-microscópica.

Para las pruebas in vivo de 15 embriones al estadio de blastocito 13 fueron transferidos por vía no quirúrgica y 2 fueron transferidos por vía quirúrgica. El diagnóstico de preñez fue realizado por ultrasonografía y palpación rectal luego de los 31 días.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Una recipiente del grupo de transferencia no quirúrgica (7,7%) y una del grupo quirúrgica (50%) se diagnosticaron preñadas a los 31 días y posteriormente confirmadas por palpación rectal a los 90 días de la transferencia. Los embriones obtenidos por fertilización in vitro son hasta el momento menos viables comparados con los obtenidos por superovulación, siendo una de sus causas su menor número de células. En un reciente trabajo con embriones fertilizados in vitro (4) se obtuvieron por transferencia no quirúrgica un 47% de gestaciones a los 35 días que disminuyó al 39% a

los 90 días. Este ensayo conjuntamente con el nuestro demostró la factibilidad de producir preñeces con embriones de fertilización in vitro. Sin embargo, es necesario destacar la necesidad de incrementar nuestra experiencia sobre esta técnica para llegar a maximizar sus resultados.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Brackett, B.G. and Zuelke, K.A.** Analysis of factors in-volved in the in vitro pro-duction of bovine embryos. *Theriogenology* 39: 43-64, 1993.
2. **Foote, R.H.** The artificial insemination industry. In: *New Technologies in Animal Breeding*. B.J. Brackett, G.E. Seidel Jr. and S.M. Seidel (eds.). New York, Academic Press, 1981, p. 13.
3. **Lazzari, G. and Galli, C.** In vitro embryo produc-tion from valuable cows slaughtered for reproductive failure or terminal illness. *Theriogenology* 39: 256, 1993.
4. **Reichenbach, H.D.; Liebrich, J.; Uberg, U. and Brem, G.** Pregnancy rates and births after unilateral or bila-teral transfer of bovine em-bryos produced in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 95: 363-370, 1992.
5. **Seidel, G.E. Jr.** Appli-cation of embryo transfer and related techno-logies to cattle. *J. Dairy Sci.* 67: 2786-2792, 1984.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece: Br. A. Fernández, Dr. A. González, Dres. C. Caorsi; M. Algorta, Dres. A. Carbo; C. Roses, A. Berrosteguieta y De Ibarra. Empresa GENSUR.

Aprobado para su publicación: 28/6 /94



Distribuidora Exclusiva:



Distribuidora:

**QUEIRUGA**

**PRODUCTOS VETERINARIOS**

**ARENAL GRANDE 2682 TEL.: 29 61 59  
MONTEVIDEO - URUGUAY**





# Asesoramiento en endoparasitosis de ovinos: siete años de experiencia

Lorenzelli, E.; Macchi, M.I.; Dondo, E.  
M.V. Ejercicio liberal. Asistencia Veterinaria Planificada.  
Laboratorio y Clínica Veterinaria "Dondo". W. Beltrán 69, Salto

## INTRODUCCION

Por datos surgidos de la última declaración jurada (DICOSE), en julio de 1993, el departamento de Salto cuenta con 635.000 vacunos y 3.114.000 lanares. Si bien algunos vacunos pertenecen a razas lecheras y están destinados a dicha producción, la mayoría son de raza de carne (principalmente Hereford) y cohabitan en sistemas de producción extensivos mixtos con los ovinos. De esta forma, la relación lanar-vacuno es de 5:1.

Las razas mayoritariamente explotadas en el departamento son Corriedale, Merino Australiano, Ideal (Polwarth) y en menor número Romney Marsh y otras razas de carne.

Los dos principales problemas sanitarios que enfrentan los ovinos son el Foot-rot y las endoparasitosis causadas por parásitos gastrointestinales.

El efecto de los parásitos gastrointestinales es muy variado, en un extremo los animales pueden morir y representa una pérdida económica total, y en el otro los efectos pueden ser tan leves que las pérdidas pasen prácticamente inadvertidas.

Entre ambos extremos hay toda una gama de secuelas económicamente importantes que involucran reducciones de ganancias de peso y

producción de lana (5).

Actualmente, en Uruguay se dispone para el control y tratamiento de las helmintiasis, de antihelmínticos de amplio espectro (bencimidazoles, levamisol/morantel e ivermectinas) y de espectro reducido (triclorfón, salicilanilidas y fenoles sustituidos).

El promedio de dosificaciones anuales con antihelmínticos en la zona de influencia del Laboratorio es de 8,2, correspondiendo por categoría 9,2 dosificaciones anuales para corderos, 8 para ovejas y 7,4 para capones (Proyecto TCP/RLA 2364, FAO, 1994. Datos no publicados).

Esto demuestra que la mayoría de los productores confía casi únicamente en el antihelmíntico como opción de control, y en la práctica la decisión de efectuar una dosificación tiene más a menudo una base empírica que epidemiológica. Los tratamientos muchas veces son efectuados a intervalos fijos (cada 4-5-semanas o menos) a lo largo del año, otras veces cuando las majadas se juntan para otras tareas, o entendiéndolo como "preventivo" cuando las condiciones climáticas supuestamente aumentaría la oferta de parásitos.

A pesar de disponerse de un amplio rango de antihelmínticos de gran eficacia, y del alto número de

dosificaciones, nuestro país seguramente no escapa a la realidad de los demás sistemas productores de carne/lana del mundo, en donde los parásitos internos del ovino se mantienen como una de las mayores causas de pérdidas económicas (9). Bajo estas circunstancias, cualquier medida efectiva para reducir el costo de evitar o eliminar una infección es justificada, particularmente ahora que el problema de resistencia antihelmíntica está emergiendo y se requiere evitar dosificaciones innecesarias (5).

El Dr. A. Castrillejo, en una exposición sobre las Dificultades en el control de parásitos internos, hace más de 10 años decía: "con un criterio eminentemente práctico, los ganaderos sustituyeron al Veterinario por el antihelmíntico, porque los Veterinarios comenzamos por sustituir el diagnóstico por el antihelmíntico" (1). Esto, aún hoy tiene plena vigencia, siendo muy escasa la participación del Médico Veterinario en el asesoramiento específico del tema parasitario.

## NUESTRA EXPERIENCIA

A partir del año 1987 al comenzar la actividad profesional se propuso encarar los aspectos parasitarios de los ovinos como uno de los puntos fundamentales de un programa de asistencia planificada

que abarca también aspectos de manejo, reproductivos, infecciosos, tanto de ovinos como de bovinos.

Son 15 los establecimientos que se han asistido en forma permanente en el tema desde el comienzo y la población de ovinos involucrada es de aproximadamente 100.000 animales. La relación lanar:vacuno varía en los mismos de 2,5:1 a 6,5:1.

Los dos pilares fundamentales del asesoramiento han sido: 1) los conocimientos de dinámica poblacional y la utilización de análisis coproparasitarios.

1) **Dinámica poblacional:** los conocimientos en este sentido proporcionados por la División de Parasitología de la DILAVE "Miguel C. Rubino" y generados por más de 400 autopsias parasitarias que comenzaron en 1974, permitieron conocer la presencia, distribución, prevalencia e incidencia de las especies potencialmente patógenas en el país (6) (7). De dichos estudios surge: a) que los ovinos desarrollan principalmente *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Nematodirus* spp y *Trichostrongylus* spp. de intestino y su distribución a lo largo del año; b) la poca importancia relativa de *Chabertia ovina*, *Bunostomum trigonocephalum* y *Strongyloides papillosus* en los ovinos del Uruguay y la mayor prevalencia de *Oesophagostomum venulosum* sobre *O. columbianum*, y c) que ovinos y bovinos tienden a desarrollar géneros de nematodes gastrointestinales diferentes (6) (7).

2) **Análisis coproparasitarios:** Comúnmente se emplean dos técnicas para determinar las cargas

parasitarias en ovinos. La primera es el contaje de nematodos post-mortem (autopsia parasitaria); este procedimiento es caro y requiere mucho tiempo y trabajo, lo que lo hace impracticable como una técnica rutinaria de campo.

La segunda es el contaje de huevos en materia fecal (hpg), técnica relativamente sencilla y de bajo costo, que nos permite procesar un gran número de muestras en un corto período de tiempo (5).

Esta técnica busca correlacionar el contaje de huevos con la carga parasitaria. Sin embargo, la validez de esta relación ha sido largamente cuestionada y debatida, porque los contajes pueden estar influenciados por múltiples factores, tanto inherentes a los distintos géneros de parásitos como a los hospedadores y que dificultarían la interpretación de los mismos (4). Sin embargo, el hpg no ha sido reemplazado en condiciones de campo (3). Es una técnica muy valiosa en trabajos experimentales y "seguimientos de campo", en los que una serie de recuentos o una comparación entre recuentos de animales de historia clínica conocida, pueden proporcionar una información importante sobre la magnitud de la carga de vermes o sobre la reacción del hospedador a estos (3).

Reconociendo entonces las limitaciones, el contaje de huevos en materia fecal es una excelente ayuda para el seguimiento parasitario de majadas, para evaluar dosificaciones, e incluso para conocer el grado de contaminación de una pastura cuando se lo utiliza a lo largo del tiempo. Como base para organizar

el manejo parasitario, se parte de un sistema de tratamientos estratégicos de cuatro dosificaciones en momentos claves del desarrollo o estado reproductivo del ovino (pre-encarnerada), pre-parto, post-parto y destete).

Estas son dadas en majadas de cría y corderos con un criterio higiénico sobre animales y pasturas, independientemente de la carga parasitaria. Por lo tanto, la validez del recuento de huevos es relativa cuando se la quiere usar como elemento de decisión en una dosificación estratégica.

Dicha afirmación no resta importancia al hpg, sino que intenta racionalizar su uso, dejándolo para aquellos momentos en que sea realmente necesario (7). En un correcto control parasitario, resulta fundamental su aplicación entre dos dosificaciones estratégicas, o como seguimiento (monitoreo) en majadas solteras (capones, borregos, ovejas refugio) y así determinar la aplicación o no de dosificaciones tácticas.

Los controles por hpg se efectúan con una frecuencia mensual. La técnica utilizada es la de Mc. Master con sensibilidad de 100 hpg. Se trabaja con muestras individuales, dependiendo el número de ellas del número de ovinos en la majada. Básicamente, se extrae un 1 a 2% del total de la majada a testar, la mitad de animales en mejor estado y la mitad de animales en peor estado; tratando de que el número nunca sea inferior a 10 muestras.

Las recomendaciones para la extracción y conservación de las muestras hasta su llegada al Laboratorio, son las sugeridas por la división de Parasitología de la

DILAVE "Miguel C. Rubino" (2).

En este sentido, es importante no trabajar con pool de materia fecal, para no aumentar las limitaciones que la técnica tiene per se.

En cuanto a la interpretación de los resultados también se sigue lo recomendado por los técnicos de la División de Parasitología de la DILAVE "Miguel C. Rubino". Se ha tomado como orientación para decidir una dosificación en animales jóvenes cuando el 50% de las muestras superan los 800 hpg, y para animales adultos los 1.000 hpg. Esto no es para nada rígido, sino que en cada caso se toma en cuenta el estado de los animales, carga animal por hectárea, época del año, dosificación anterior, estado fisiológico de los animales y edad.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos hasta el momento con este tipo de asesoramiento han sido positivos y rápidamente apreciables, siendo los logros más importantes: 1) la drástica disminución del número de dosificaciones anuales, y 2) posibilitar el diagnóstico de resistencia a antihelmínticos.

1) La disminución del número de dosificaciones reduce sin dudas los costos para el productor, tanto en específicos como en mano de obra, y desde el punto de vista técnico disminuye la presión antihelmíntica sobre los nematodos, lográndose una utilización más racional de las drogas. El promedio de dosificaciones anual en estos establecimientos es de 4.

2) En el transcurso del trabajo, a comienzos del año 1989 y conjuntamente con la División de

Cuadro 1

### Resistencia a antihelmínticos en ovinos en el Uruguay

Resistencia única a bencimidazoles	17 (56,6%)
Resistencia única a levamisol/morantel	1 (3,3%)
Resistencia a bencimidazoles y levamisol/morantel	10 (33,3%)
Resistencia a bencimidazoles, levamisol/morantel y a la combinación BZ.LVM	2 (6,6%)

Parasitología de la DILAVE "Miguel C. Rubino" se comenzó el estudio de lo que sería el primer diagnóstico de Resistencia a antihelmínticos en ovinos en Uruguay (8).

A partir de ahí se chequearon 29 establecimientos más y en el 100% se diagnosticó resistencia, según se detalla en el cuadro 1. Se desprende de este cuadro, que los bencimidazoles están implicados en 29 de los 30 casos estudiados (96,6%) y el grupo levamisol/morantel en 13 (43%).

A su vez, la distribución relativa de géneros de nematodos gastrointestinales determinada por autopsias parasitarias o cultivos de larvas fue la siguiente:

- Trichostrongylus: 76%
- Haemonchus: 65%
- Ostertagia: 35%
- Nematodirus: 18%

En uno de estos establecimientos se diagnosticó resistencia de Haemonchus al closantel, constituyéndose en el primer diagnóstico de este tipo en Uruguay (datos no publicados, 1993).

## CONCLUSIONES

El asesoramiento hoy, entonces, está dirigido al control parasitario por un lado y al manejo de la resistencia por otro.

Se realiza un test de reducción de conteo de huevos (Lombritest) en cada establecimiento por año, para utilizar drogas con comprobada eficacia; rotación anual de núcleo químico que varía según el caso e inclusión de 1 o 2 dosificaciones con drogas de espectro reducido (closantel o triclorfón) en momentos de predominancia de H. contortus (verano-otoño).

Es de destacar la importancia del recuento de huevos, que siendo una técnica sencilla y a pesar de las limitaciones, permite, además de los usos mencionados, obtener información sobre la eficacia de las drogas, o mejor dicho conocer la sensibilidad de los parásitos a los diferentes núcleos químicos, es decir, posibilita el diagnóstico de resistencia antihelmíntica.

En muy pocas situaciones se ha incidido en el manejo de los potreros con criterio parasitario (rotaciones, descanso de potreros).

La participación ha sido fundamentalmente la determinación de la droga a utilizar, el monitoreo y la aplicación de los conocimientos epidemiológicos, lo que parece ser bastante a la luz de los resultados hasta ahora obtenidos y de donde se concluye que se está dosificando inne-

cesariamente a los ovinos en aquellos establecimientos sin ningún tipo de control. No se ha comprobado científicamente si el reducido número de dosificaciones que se maneja en estos establecimientos es compatible con la máxima producción. a juzgar por los parámetros comúnmente evaluados sí (peso de vellón para cada categoría, peso de las borregas a la encarnada), pero futuras investigaciones deberán esclarecerlo.

Por último, se transcribe textualmente un mensaje del Dr. Armando Nari a la profesión; mensaje que a juicio de los autores resume la filosofía de trabajo en el tema en cuestión: "el profesional debe emplear la información epidemiológica disponible y los conceptos sobre el manejo parasitario de la pastura, así como la información correspondiente a la eficacia y características (absorción, metabolismo, excreción) del antihelmíntico a utilizar. Reunir información completa en este sentido, es a veces difícil para el profesional que trabaja en el ejercicio libre. Sin embargo, ir perfeccionando este enfoque es la única manera de marcar la diferencia entre la simple compra de un antihelmíntico y un asesoramiento técnico, que ofrece al profesional un nuevo punto de contacto con el productor" (6).

#### AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Armando Nari, por el constante apoyo y la permanente docencia para con nosotros.

- Al equipo de la División de

Parasitología de la DILAVE "Miguel C. Rubino", por la colaboración desinteresada en innumerables situaciones.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Castrillejo, A.** Dificultades en el control de parásitos internos. *Veterinaria* 88.89:49-51, jul-dic 1984.
2. **División Parasitología. DILAVE "Miguel C. Rubino".** Manual de remisión de material para diagnóstico parasitológico. Mimeografiado.
3. **Fiel, César A. y Steffan, Pedro E.** Procedimientos para el diagnóstico de nematodos en bovinos. Manual auspiciado por Hoescht, Argentina.
4. **Mc. Kenna, P.B.** The diagnostic value and interpretation of faecal egg counts in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 29:129-132, 1981.
5. **Mc Kenna, P.B.** The estimation of gastrointestinal strongyle worm burdens in young sheep flocks: A new approach to the interpretation of faecal egg counts. I Development. *New Zealand Veterinary Journal*, 35:94-97, 1987.
6. **Nari, A. y Cardozo, H.**

Enfermedades causadas por parásitos internos. 1) Nematodos gastrointestinales. In: Bonino, J.; Durán del Campo, A. Mari, J.J. eds. *Enfermedades de los lanares.* Montevideo, Hemisferio Sur. Uruguay. 1987, pp.1-57.

7. **Nari, A. et al.** Dinámica de población para nematodos gastrointestinales de ovinos en Uruguay. *Veterinaria* 14(66):11-24, 1977.
8. **Nari, A.; Herrmann, P.; Lorenzelli, E.; Rizzo, E.; Macchi, M.I.** Resistencia de *Trichostrongylus colubrifomis* a oxfendazole: primera comunicación en Uruguay. *Veterinaria* 26(107):5-9, ene.-mar.1990.
9. **Nari, A.; Lorenzelli, E.; Quintana, S.; Franchi, M.** Estado actual de la resistencia antihelmíntica de los nematodos gastrointestinales del ovino. Un problema emergente en Uruguay. *Revista Agropecuaria* N°11,1-26. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay.

#### LITERATURA SUGERIDA

**Nari, A.** Enfoque epidemiológico sobre el diagnóstico y control de resistencia a antihelmínticos en ovinos. Editorial Hemisferio Sur, p.60. Montevideo, Uruguay.