

**Evaluación de la fertilidad utilizando  
Bullplus™ para sexar semen convencional en  
vacas de ganado de carne**

**Anastasia Nathaly Mora Carrión  
Jeannira Nathaly Montaña Villalba**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**  
Noviembre, 2015

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

# **Evaluación de la fertilidad utilizando Bullplus™ para sexar semen convencional en vacas de ganado de carne**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingenieros Agrónomos en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Anastasia Nathaly Mora Carrión**  
**Jeannira Nathaly Montaña Villalba**

**Zamorano, Honduras**

Noviembre, 2015

# **Evaluación de la fertilidad utilizando Bullplus™ para sexar semen convencional en vacas de ganado de carne**

Presentado por:

Anastasia Nathaly Mora Carrión  
Jeannira Nathaly Montaña Villalba

Aprobado:

---

Isidro A. Matamoros, Ph.D.  
Asesor principal

---

John Jairo Hincapié, Ph.D.  
Director  
Departamento de Ciencia  
y Producción Agropecuaria

---

John Jairo Hincapié, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl H. Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

---

Guillermo E. Zelaya, Ing. Agr.  
Asesor

---

Kenia David, Ing. Agr.  
Asesor

## **Evaluación de la fertilidad utilizando Bullplus™ para sexar semen convencional en vacas de ganado de carne.**

**Anastasia Nathaly Mora Carrión  
Jeannira Nathaly Montaña Villalba**

**Resumen:** El objetivo del estudio fue evaluar la fertilidad utilizando el vial Bullplus™ para sexar semen en comparación con el uso del vial Heiferplus™ para sexar semen y con semen convencional en vacas de ganado de carne a primer servicio. Para el estudio se utilizaron 43 vacas multíparas de la Unidad de Ganado de Carne, en la Escuela Agrícola Panamericana el Zamorano, Honduras. Las vacas fueron tonificadas previo a la sincronización de celo, la inseminación se realizó a celo detectado aplicando la regla de inseminación AM/PM y las vacas se inseminaron con semen sexado utilizando Bullplus™. Se realizó la detección temprana de preñez con la prueba ELISA a los 28 días pos inseminación. El estudio se comparó con 76 vacas que fueron inseminadas con semen sexado utilizando Heiferplus™ y con 305 vacas inseminadas con semen convencional. Se analizó el Porcentaje de Preñez a Primer Servicio (PPPS) y los servicios por concepción (S/C) con una diferencia ( $P \leq 0.05$ ). Hubo diferencia en el PPPS, 20.78% con Heiferplus™, 32.56% con Bullplus™ y 27.87% con semen convencional. Al hacer un análisis de frecuencia ( $P = 0.1530$ ) comparando Bullplus™ y HeiferPlus™, indica una tendencia fuerte de que Bullplus™ tenga mayor fertilidad a primer servicio que Heiferplus™. En servicios por concepción (S/C), hubo diferencia y se observó una media de 4.93, 3.07 y 3.57 para los tratamientos de Heiferplus™, Bullplus™ y semen convencional, respectivamente. Se concluyó que el porcentaje de preñez a primer servicio con Bullplus™ y semen convencional fue superior a Heiferplus™. Los tratamientos con Bullplus™ y semen convencional obtuvieron un menor número de servicios por concepción en comparación con Heiferplus™.

**Palabras clave:** Inseminación, fertilidad, servicio por concepción, semen sexado.

**Abstract:** The study's objective was to evaluate fertility of Bullplus™ for sexed semen compared with vial Heiferplus™ for sexed semen and with conventional semen in beef cows, first service. For the study used 43 multiparous cows of the Beef Cattle Unit at the Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. The cows were toned prior to estrus synchronization, the insemination was performed at detected estrus applying the rule of insemination AM / PM and which were inseminated with sexed semen using Bullplus™. Early pregnancy detection was performed using the ELISA test at 28 days after insemination. The study was compared with 76 cows were inseminated with Heiferplus™ and with 305 cows inseminated with conventional semen. Analysis of the Percentage of Pregnancy to First Service (PPFS) and Services per Conception (S / C) with a difference ( $P \leq 0.05$ ). There were differences in the PPFS, with Heiferplus™ 20.78%, Bullplus™ 32.56% and conventional semen 27.87% were made. In analyzing the frequency ( $P = 0.1530$ ) comparing Bullplus™ and Heiferplus™, there a strong tendency towards Bullplus™ which provided higher fertility rates than Heiferplus™. Services per Conception (S / C) present a difference and 4.93, 3.07 and 3.57 straws for conception were observed for Heiferplus™, Bullplus™ and conventional semen, respectively. In conclusion the percentage of pregnancy to first service with Bullplus™ and conventional semen was higher than Heiferplus™. The

treatments with Bullplus™ and conventional semen obtained less services per conception in comparison with Heiferplus™.

**Keywords:** insemination, fertility, service per conception, sexed semen.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de Firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	v
Índice de Cuadros .....	vi
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>8</b>
<b>5 RECOMENDACIONES .....</b>	<b>9</b>
<b>6 LITERATURA CITADA .....</b>	<b>10</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Protocolo para la sincronización de celo en la evaluación de la fertilidad utilizando BullPlus™ para sexar semen convencional en vacas de ganado de carne .....	4
2. Comparación de medias de Servicios por Concepción (S/C) y Porcentaje de Preñez a Primer Servicio (PPPS), entre los tratamientos Heiferplus™, Bullplus™ y semen convencional .....	6

## 1. INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que contribuyen para mejorar el retorno económico de una explotación ganadera. La tasa de preñez y sobre todo su distribución, tienen un impacto muy importante sobre la ecuación económica de un establecimiento de cría. Lograr un ternero por vaca por año en un sistema de producción bovina, significa que la hacienda tiene niveles de eficiencia elevados (Cutaia *et al.* 2011).

En ganadería de carne, los factores reproductivos beneficiosos a considerar son la edad de pubertad, madurez sexual, fertilidad, conducta materna y adaptación a cambios ambientales. Para el apareamiento de las vacas se puede implementar el uso de semen enriquecido con cromosoma Y proveniente de toros genéticamente superiores, esto aumentaría el beneficio económico y los nacimientos de machos para la venta (Hohenboken 1999).

Determinar el sexo de la descendencia es trascendental, después de varios intentos con resultados poco confiables, el método más utilizado para la separación de cromosomas es la citometría de flujo desarrollada por el Dr. Lawrence Johnson, en 1992. La técnica de citometría de flujo se basa en la mayor cantidad de ADN que existe en los espermatozoides con cromosoma X respecto a los espermatozoides con cromosoma Y (Arroyo 2008).

El sexado del semen es una tecnología de creciente utilización y máximo interés en los programas de inseminación artificial (IA) del ganado de carne. Sus efectos sobre la tasa de parición de hembras modificarían positivamente los porcentajes de reposición y los costos de crianza de machos. Su utilización en programas de inseminación a celo detectado demuestra porcentajes de preñez promedio que oscilan entre 50 y 55% (Marini y Galassi 2011).

Mediante la técnica de citometría de flujo, el semen es teñido con un colorante fluorescente (p.e. Hoechst 33342) que penetra la membrana espermática, se adhiere al ADN, y tiene la propiedad de producir fluorescencia cuando se somete a la luz de un rayo láser: a mayor cantidad de ADN (espermatozoides con cromosoma X), mayor fluorescencia o luminosidad. Mediante la utilización de un aparato separador de células conocido técnicamente como citómetro de flujo se detecta la diferencia en la fluorescencia de los espermatozoides, la cual es procesada por un software que permite seleccionar la población de espermatozoides con mayor luminosidad (cromosoma X) o con menor luminosidad (cromosoma Y), desviarlos del flujo original y recolectarlos en un tubo para su posterior congelación (Arroyo 2008).

La diferencia en el contenido de ADN entre los espermatozoides bovinos que llevan el cromosoma X es 3.8% más con respecto al cromosoma Y. El cromosoma X es mayor que el cromosoma Y debido a una mayor cantidad de cromatina heteróloga (Cantarelli y Hossepian 2001).

La baja tasa de concepción después de usar semen sexado, se puede deber al daño que sufre el espermatozoide durante el proceso de tinción previo a la citometría de flujo, por la exposición del espermatozoide a un poderoso rayo láser durante la separación de células y por la centrifugación que se requiere para concentrar el semen antes de llenar las pajillas. Otros factores que pueden reducir aún más la tasa de concepción al usar semen sexado pueden ser la incapacidad que existe actualmente de determinar, antes de la separación, si una muestra de semen bovino será capaz de resistir la separación por sexos, la congelación y la descongelación manteniendo todavía una fertilidad aceptable (Seidel y Shenck 2006)

Una dosis de semen congelado convencional para ser empleado en inseminación artificial generalmente tiene unos 20 millones de espermatozoides, a pesar de que la mitad es suficiente para lograr una fertilidad satisfactoria. Un citómetro selecciona unos 10 millones de espermatozoides sexados por hora, por lo que sería muy costoso mantener aquella concentración (Arroyo 2008).

BullPlus™ es un agente espermático liofilizado, utilizado para el sexado de semen que acelera la motilidad del cromosoma Y (masculino) y reduce la motilidad del cromosoma X (femenino). El agente espermático es activado por la adición de semen bovino directamente al vial BullPlus™. El semen es descongelado normalmente y se mezcla con el vial, se incuba por 20 minutos y el semen sexado está listo para la inseminación artificial (Emlab Genetics 2013).

El objetivo del estudio fue evaluar la fertilidad utilizando el vial Bullplus™ en comparación con el uso del vial Heiferplus™ para sexar semen y con semen convencional en vacas de ganado de carne a primer servicio.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación se realizó entre julio y septiembre de 2015, en la Unidad de Ganado de Carne, Escuela Agrícola Panamericana el Zamorano, Honduras. Con una altura promedio de 800 msnm, precipitación promedio anual de 1100 mm y una temperatura promedio anual de 26°C.

Se utilizaron 43 vacas de ganado de carne que fueron seleccionadas en base a su desempeño reproductivo y fueron sometidas a palpación rectal por el Médico Veterinario y de esta manera se aseguró que los animales estuvieran en el adecuado estado de salud y desarrollo de sus órganos reproductivos. Las razas utilizadas fueron Brahman y sus encastes con Charolais, Senepol y Simmental.

Los criterios de selección de las vacas para ser inseminadas fueron: haber alcanzado un peso mínimo de 450 kg en etapa reproductiva y con más de 60 días posparto. Presentar una condición corporal de 5 a 7 en la escala de 1 a 9 para ganado de carne. Al momento de la inseminación artificial se revisó que el moco estral presentara las características de transparencia, fluidez y sin coloración turbia.

Todos los animales estuvieron bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación que consistió en pastoreo rotacional con pasto estrella *Cynodon nlemfuensis* y con pasto guinea *Panicum máximum*, así mismo fueron suplementadas con bloques multinutricionales y balanceado. Las vacas fueron desparasitadas, después se realizó manipulación uterina y separación del ternero (MUST) por 72 horas al momento de iniciar alimentación estratégica para suplementar terneros antes del destete. Se aplicó Catofos<sup>®</sup> + Compol<sup>®</sup> + Suplenut<sup>®</sup> + SeVe<sup>®</sup> como tonificación a todas las vacas. Después de siete días se inició el protocolo de sincronización de celo.

La inseminación se realizó a celo detectado aplicando la regla AM/PM y se utilizó el vial BullPlus<sup>™</sup> para sexar el semen. Según la empresa Emlab Genetics, BullPlus<sup>™</sup> incrementa la motilidad del cromosoma Y que dará como resultado más terneros machos sin comprometer la fertilidad y no requiere equipos especializados de manejo. El Cuadro 1 muestra el protocolo para la sincronización de celo.

Cuadro 1. Protocolo para la sincronización de celo en la evaluación de la fertilidad utilizando BullPlus™ para sexar semen convencional en vacas de ganado de carne.

Día 0	Día 8	Día 9 a 11
Aplicar DIV-B® +2 mg de BE +10 mL Catofos®	Retirar DIV-B® +1 mg de BE +500 µg PGF <sub>2</sub> α +400 UI eCG +10 mL Catofos®	IACD con Bullplus™ de 12 a 18 horas de retirado el DIV-B® +2 mL GnRH +10 mL Catofos®.

BE: Benzoato de estradiol.

IACD: Inseminación artificial a celo detectado.

DIV-B®: Dispositivo intravaginal bovino.

eCG: Gonadotropina coriónica equina.

PGF<sub>2</sub>α: Prostaglandina F<sub>2</sub> alfa.

La aplicación de todos los productos se realizó vía intramuscular profunda utilizando agujas calibre 18 × 1<sup>1/2</sup>. El dispositivo intravaginal que se utilizó fue DIV-B® (Syntex s.f.a), cada dispositivo contiene 1.0 g de progesterona montado en una base de silicona inerte. La fuente de Benzoato de Estradiol (BE) fue Gonadiol® que contiene 1 mg de BE/mL (Syntex s.f.b). Se utilizó el producto Novormon® (Syntex s.f.c) como fuente de gonadotropina coriónica equina (eCG) que contiene 400 UI de eCG/mL equivalente a 2 mL de Novormon®. Se utilizó también como fuente de PGF<sub>2</sub>α el producto Ciclase® que contiene 250 µg de D + Cloprostenol 1/mL (Syntex s.f.d). Como fuente de gonadotropina (GnRH) el producto Gonasyn®. Como estimulante fósforo orgánico con vitaminas hematopoyéticas, el producto Catofos® (ácido fosfonoso butafosfan) 100 mg, vitamina B9 (ácido fólico) 15 mg, vitamina B 12 (cianocobalamina) 25 mL (Agrovetmarket s.f).

Para el uso de Bullplus™ se descongeló el semen y el vial a 37°C y se utilizó baño de agua, se cortó la pajilla de semen a un ángulo de 60° con tijeras afiladas, se perforó el sello del vial con una aguja y se insertó el extremo cortado de la pajilla en el vial, se sujetó tanto el vial y la pajilla en la palma de la mano y se agitó de arriba hacia abajo 4 veces, similar a sacudir un termómetro de vidrio. Se aseguró que todo el semen se encuentre en el vial, se transfirió el semen enriquecido del vial de nuevo en la pajilla, se hizo esto sujetando el vial y la pajilla en una posición invertida y otra vez se sacudió 4 veces. Se aseguró nuevamente de que todo el semen esté en la pajilla.

Es importante incubar el semen enriquecido del agente que contiene el vial a una temperatura de 37 °C durante 20 minutos. Después de terminar el periodo de incubación se retiró la pajilla del baño de agua, se cargó en la pistola de inseminación y se procedió a inseminar la vaca con la pajilla de semen sexado utilizando Bullplus™.

Para determinar la preñez se utilizó el kit de detección temprana de gestación IDDEXX®, diagnóstico para determinar PGA (proteína asociada a la gestación) en el plasma sanguíneo por prueba ELISA, que contiene los siguientes reactivos: Control positivo, control negativo, detección de solución, conjugado, TMB substrato, solución de frenado, micro placa de ELISA con 96 pocillos que contiene el anticuerpo de PGA.

Se recolectó 4 mL de sangre de las venas coccígeas en tubos de ensayo al día 28 pos inseminación artificial. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente después de la recolección, para evitar la coagulación por 3 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) en una centrífuga portátil, se transfirió el plasma obtenido a pipetas eppendorf, para realizar la prueba ELISA.

Se analizaron las siguientes variables: Porcentaje de Preñez Primer Servicio (PPPS) y Servicio por concepción (S/C) a Primer Servicio. Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA), con tres tratamientos. La variable S/C fue analizada utilizando el análisis de varianza (ANDEVA) y separación de medias con la prueba de Duncan. La variable PPPS se analizó con la prueba de Chi cuadrado ( $X^2$ ). El nivel de significancia exigido fue de  $P \leq 0.05$ , utilizando el programa “Statistical Analysis System” (SAS® 9.3)

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los servicios por concepción para el primer servicio entre el semen sexado utilizando Heiferplus™, Bullplus™ y el semen convencional presentan diferencia ( $P \leq 0.0001$ ), con una media de 4.93 pajillas para semen sexado utilizando Heiferplus™, una media de 3.07 para semen sexado utilizando Bullplus™ y una media de 3.57 para semen convencional. No hubo una diferencia entre semen sexado utilizando Bullplus™ y semen convencional, sin embargo si hubo una diferencia entre semen sexado utilizando Heiferplus™ en comparación con los otros dos tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación de medias de Servicios por Concepción (S/C) y Porcentaje de Preñez a Primer Servicio (PPPS), entre los tratamientos Heiferplus™, Bullplus™ y semen convencional.

Tratamiento	n	S/V	S/C	PPPS (%)
Heiferplus™	76	1	4.93 a	20.78 a
Bullplus™	43	1	3.07 b	32.56 b
Convencional	305	1	3.57 b	27.87 b
Probabilidad		>0.05	$\leq 0.0001$	$\leq 0.0001$
CV %		0	22.84	22.84

a y b: Medidas en la misma columna seguidas de diferente letra, difieren entre sí ( $P \leq 0.05$ )

n: Número de animales.

S/V: Servicio por vaca.

Para el Porcentaje de Preñez a Primer Servicio (PPPS) si existe una diferencia comparando Heiferplus™ contra Bullplus™ y semen convencional. Siendo esta diferencia a favor de Bullplus™ con 32.56% y semen convencional con 27.87% (Cuadro 2).

Al hacer un análisis de frecuencia con una ( $P=0.1530$ ), comparando semen sexado utilizando Bullplus™ y Heiferplus™, indica una tendencia fuerte de que Bullplus™ tenga mayor fertilidad que Heiferplus™ (Cuadro 2).

En un estudio realizado en la Hacienda Santa Elisa y en la propiedad IAGSA en Honduras por Rentería Briceño y Soto García (2013) presentaron un PPPS con semen sexado en vaquillas de ganado lechero de 54.4% por lo tanto se concluye que el estudio se encuentra bajo estos valores.

En un estudio hecho en la Universidad de Firat en Turquía obtuvieron un porcentaje de preñez acumulada en vacas de 64.0% con semen sexado utilizando Bullplus™ en este caso el estudio se encuentra por debajo de lo establecido por (Turk *et.al* 2015). Existen datos en vaquillas que respaldan la expectativa de una reducción en la tasa promedio de concepción con semen sexado de 70 a 85% de la que se obtiene con el semen convencional a primer servicio (Seidel y Johnson 1999).

En un estudio en la Universidad de Florida, novillas inseminadas con semen sexado presentaron una tasa de preñez del 35% en comparación con 55% para semen convencional, sin embargo, la tecnología mostró ser efectiva para producir las crías del sexo deseado (Moore y Thatcher 2004).

#### **4. CONCLUSIONES**

- El porcentaje de preñez a primer servicio con Bullplus™ y convencional fue superior a Heiferplus™.
- Los tratamientos con Bullplus™ y convencional obtuvieron un menor número de servicios por concepción en comparación con Heiferplus™.
- La fertilidad de semen sexado utilizando Bullplus™ no disminuyó en comparación con semen convencional, lo cual indica que la fertilidad en el hato se mantuvo con el uso de semen sexado utilizando Bullplus™ y el beneficio es obtener el sexo esperado.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Darle seguimiento a este estudio para medir el porcentaje de machos y hembras de las crías.
- Realizar un estudio comparando el uso de Bullplus™ para sexar semen contra semen sexado en vaquillas.
- Hacer un estudio con grupos más numerosos de vacas, para obtener mayor información en el trópico.

## 6. LITERATURA CITADA

Agrovvetmarket. sf. Catofos® (en línea). Consultado el 16 de julio de 2015. Disponible en <http://goo.gl/ctRf90>

Arroyo, A. 2008. Sexado de semen una nueva herramienta para la producción de carne. Revista Angus, 241:37-39

Cantarelli, L. y V. Hossepian. 2001. Biotecnología de la reproducción, Selección del sexo en mamíferos. Trad. Gustavo Palma. Argentina. Capítulo 16. 336 p.

Cutaia, L., P. Chesta y E. Balla. 2011. Impacto de los programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría (en línea). Consultado 25 de mayo de 2015. Disponible en <http://www.estanciasvh.com/?p=538>

Emlab Genetics. 2013. BullPlus™ Semen sexing agent – Bovine/Male (en línea). Consultado 27 de mayo de 2015. Disponible en: <http://www.emlabgenetics.com/Pages/BULLPLUS.aspx>

Hohenboken, W. 1999. Theriogenology. Applications of Sexed Semen in Cattle Production. 52:1421-1433.

Marini, P. y I. Galassi. 2011. Relación entre celo-inseminación con semen sexado y porcentaje de preñez en vaquillonas Holstein. Santa Fe, Argentina. Sitio argentino de Producción Animal. 22:52-54.

Moore, K. y W. Thatcher. 2004. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. Gainesville, USA. 89:1254-1266.

Rentería Briceño, C. y S. Soto García. 2013. Evaluación del uso de semen sexado contra semen convencional en vaquillas de leche en la finca de Ingeniería Agrícola y Ganadería S.A (IAGSA), Comayagua, Honduras. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 6 p.

SAS® 9.3 TS1M2.2012. SAS Institute Inc. Cary, NC.

Seidel, G. y L. Johnson. 1999. Theriogenology. Sexing mammalian sperm. USA. 1268-1272 p.

Seidel, G. y J. Shenck. 2006. Sex selected semen. South Dakota, USA. pp 261-267.

Syntex. sfa. Dispositivo intravaginal bovino Syntex® (DIB®) (en línea). Consultado 16 de julio de 2015. Disponible en <http://goo.gl/9GPnG2>.

Syntex. sfb. Benzoato de Estradiol Syntex® (en línea). Consultado 16 de julio de 2015. Disponible en <http://goo.gl/1UZvQu>

Syntex. sfc. Novormon® 5000 (en línea). Consultado el 16 de julio de 2015. Disponible en <http://goo.gl/UV0Q5A>

Syntex. sfd. Ciclase DL® (en línea). Consultado el 16 de julio de 2015. Disponible en <http://goo.gl/g0d0eS>

Turk, G., M. Yuksel., M. Sonmez., S. Gu., S. Ozer. y E. Demirci. 2015. Effects of semen sexing kits (Heiferplus™ and Bullplus™) supplemented to frozen-thawed bull semen on pregnancy rates, foetal sex ratios and selected reproductive parameters in cows. Turquía. 309-313 p.