

01682



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE UN TRATAMIENTO CORTO DE SOMATOTROPINA
BOVINA SOBRE NIVELES HORMONALES, ACTIVIDAD OVARICA
Y DESARROLLO EMBRIONARIO EN HEMBRAS HOLSTEIN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

P R E S E N T A:

JOSE SALVADOR MORALES ROURA

ASESORES: LUIS ZARCO QUINTERO
JOEL HERNANDEZ CERON

MEXICO, D. F.

2000

285665





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Es mi deseo, como autor, agradecer a las siguientes personas las cuales intervinieron directa o indirectamente en la realización del presente trabajo:

-A los asesores, especialmente a mi amigo y guía académico, el Dr. Joel Hernández Cerón, quien a lo largo de los años ha mostrado un auténtico interés en mi desarrollo personal y profesional.

-Al comité tutorial, especialmente a quienes, entendiendo la importancia de los seminarios para quienes lo presentan y apartándose de sus importantes actividades, asistían a ellos.

-Al MVZ Javier Hernández Ignacio, quien, siempre desinteresadamente, colaboró en la realización de los dos experimentos con embriones detallados en la tesis, espero poder compensar tanto trabajo algún día.

-Al MVZ Alain Ducoing Zamudio, a quien su amistad permitió tolerar los inconvenientes de las largas noches de trabajo y colaboró arduamente durante la realización del primer experimento.

-A las MVZ's Susana Rojas y Clara Murcia por su invaluable ayuda en las determinaciones hormonales correspondientes a este estudio.

-A mi esposa Soila y a mis hijos Linda Montserrat y José Salvador, quienes en todo momento me han apoyado durante la realización del posgrado. Gracias por existir y entender que las guerras se ganan con el esfuerzo común. Pido perdón por el sacrificio requerido.

-A mi familia, por su apoyo y respeto, particularmente a mi madre (qepd) quien, con su partida, me enseñó más de la vida que tres décadas dedicadas a la escuela.

-A quienes se atreven a pensar diferente y le dan a la humanidad la oportunidad de utilizar caminos diferentes en su trayecto al horizonte.

Resumen

MORALES ROURA JOSE SALVADOR. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina sobre niveles hormonales, actividad ovárica y desarrollo embrionario en hembras Holstein (bajo la dirección de Luis Zarco Quintero y Joel Hernández Cerón).

Con el objetivo de determinar el efecto de la aplicación de 500 mg de rbST al inicio del estro sobre algunas funciones reproductivas de hembras Holstein se realizaron tres experimentos. En el primero fueron utilizadas vaquillas y se determinó el diámetro máximo del folículo ovulatorio (16.0 ± 0.47 mm y 15.1 ± 0.51 mm), el intervalo inicio del estro-ovulación (27.1 ± 1.1 y 27.8 ± 1.2 horas), el diámetro del cuerpo lúteo al día 7 post-estro (24.0 ± 1.2 mm y 24.8 ± 1.4 mm) y al día 10 (26.6 ± 1.1 mm y 26.1 ± 1.3 mm), sin que se encontrara diferencia ($P > 0.05$). Las concentraciones de estradiol 17β el día del estro y de progesterona plasmática hasta el día 10 post-estro tampoco difirieron ($P > 0.05$) entre grupos. En el segundo experimento, utilizando vacas superovuladas de primer servicio, se comparó el número total de óvulos y embriones (6.14 ± 1.41 y 4.6 ± 1.47), el número de embriones transferibles (2.29 ± 1.41 y 3.44 ± 1.47) y el porcentaje de embriones transferibles (88.9% y 100%) así como las concentraciones de progesterona sérica hasta el día 7 post-estro, sin que se detectaran diferencias ($P > 0.05$). En el tercer experimento se utilizaron vacas repetidoras superovuladas y también se comparó el número total de óvulos y embriones (5.5 ± 1.49 y 5.13 ± 1.96), el número de embriones transferibles (3.38 ± 1.08 y 1.75 ± 1.37) y las concentraciones de progesterona sérica, sin encontrar diferencia en ninguno de los casos ($P > 0.05$). El porcentaje de embriones transferibles, en cambio, sí fue diferente (84.38% y 54.55%, $P < 0.05$). Se concluye que la administración de 500 mg de rbST al inicio del estro mejora la calidad embrionaria de vacas repetidoras superovuladas pero no así de las vacas de primer servicio, y que no afecta ni el número de embriones obtenidos ni los niveles de progesterona circulante de ambos tipos de hembras. Tampoco modifica las concentraciones de estradiol 17β del día del estro, progesterona hasta el día 10, tiempo de ovulación, diámetro máximo del folículo ovulatorio ni del cuerpo lúteo de vaquillas.

Palabras clave: rbST, SOMATOTROPINA, PROGESTERONA, EMBRION, VACA REPETIDORA

Abstract

MORALES ROURA JOSE SALVADOR. Effect of a short-term treatment of bovine somatotropin on hormonal levels, ovarian activity and embryo development in Holstein females (under the direction of Luis Zarco Quintero and Joel Hernández Cerón).

With the objective of determine the effect of 500 mg of rbST at the beginning of the estrus were made three experiments. In the first, using Holstein heifers, were determined the maximum diameter of the ovulatory follicle (16.0 ± 0.47 mm vs 15.1 ± 0.51 mm), the beginning of the estrus-ovulation interval (27.1 ± 1.1 vs 27.8 ± 1.2 hours), the corpus luteum diameter at day 7 (24.0 ± 1.2 mm vs 24.8 ± 1.4 mm) and 10 (26.6 ± 1.1 mm vs 26.1 ± 1.3 mm) without differences ($P > 0.05$) between groups. The estrus day 17- β estradiol and progesterone until day 10 levels neither shown differences ($P > 0.05$). In the second experiment, using superovulated first-service Holstein cows, were compared the total number of ovum and embryos (6.14 ± 1.41 vs 4.6 ± 1.47), the number of transferable embryos (2.29 ± 1.41 vs 3.44 ± 1.47), the percentage of transferable embryos (88.9% vs 100%) and the progesterone levels until day 7, without find differences ($P > 0.05$). In the third experiment, using superovulated repeat-breeder Holstein cows, also were compared the total number of ovum and embryos (5.5 ± 1.49 vs 5.13 ± 1.96), the number of transferable embryos (3.38 ± 1.08 vs 1.75 ± 1.37) and the progesterone levels, without differences ($P > 0.05$). On the other hand, the percentage of transferable embryos was different (84.38% vs 54.55%, $P < 0.05$). It was concluded that the 500 mg rbST treatment at the beginning of the estrus improve the embryo quality in superovulated repeat-breeder cows but not in first-service cows. Neither affect the number of embryos nor the progesterone levels of both kind of cows. Neither affect the estrus day 17- β estradiol and progesterone until day 10 levels, ovulation time, maximum diameter of ovulatory follicle and corpus luteum of heifers.

Key words: rbST, SOMATOTROPIN, PROGESTERONE, EMBRYO, REPEAT-BREEDER

Contenido

Capítulo 1.	
Introducción	1
Capítulo 2.	
Revisión de literatura	
2.1 Mortalidad embrionaria	4
2.2 Somatotropina bovina e IGF-I en eventos reproductivos.....	12
Capítulo 3.	
Efecto de la administración de rbST al inicio del estro sobre el diámetro del folículo ovulatorio, concentraciones de estradiol, momento de la ovulación y función del cuerpo lúteo de vaquillas Holstein	19
Capítulo 4.	
Efecto de la administración de rbST al inicio del estro sobre el desarrollo embrionario y las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein superovuladas al primer servicio	29
Capítulo 5.	
Efecto de la administración de rbST al inicio del estro sobre el desarrollo embrionario y las concentraciones de progesterona plasmática de vacas Holstein repetidoras superovuladas	40
Capítulo 6.	
Discusión general	53
Capítulo 7.	
Referencias.....	60

Lista de Cuadros y Figuras

Cuadro 3.1. Concentraciones de estradiol 17β plasmático en vaquillas Holstein tratadas con 500 mg de rbST al inicio del estro y en vaquillas testigo.....	24
Figura 3.1. Progesterona plasmática de vaquillas Holstein tratadas con 500 mg de rbST al inicio del estro y vaquillas testigo.....	25
Cuadro 4.1. Respuesta superovulatoria de vacas Holstein tratadas con 500 mg de rbST al inicio del estro y vacas testigo.....	35
Cuadro 4.2. Niveles de progesterona sérica de vacas Holstein superovuladas tratadas con 500 mg de rbST al inicio del estro y vacas testigo.....	36
Cuadro 5.1. Respuesta superovulatoria de vacas Holstein repetidoras tratadas con 500 mg de rbST al inicio del estro y vacas testigo.....	47
Cuadro 5.2. Etapa de desarrollo y calidad de embriones obtenidos de vacas Holstein repetidoras tratadas con 500 mg de rbST al inicio del estro y vacas testigo.....	48
Cuadro 5.3. Niveles de progesterona sérica de vacas Holstein repetidoras superovuladas tratadas con 500 mg de rbST al inicio del estro y vacas testigo.....	49

Capítulo 1. Introducción

La infertilidad continúa siendo la principal causa de desecho de los bovinos lecheros (Bascom y Young, 1998). Se ha determinado que dicha infertilidad es debida, más que a una falla en la fertilización, a una mortalidad embrionaria posterior, la cual está caracterizada por una deficiente diferenciación celular y un retardo en el desarrollo de los embriones (Linares, 1982; Gustafsson, 1985; Peterson *et al.*, 1999).

Se han postulado un gran número de agentes causales de infertilidad (Ayalon, 1981; Zavy, 1994) entre los que destaca el efecto de un ambiente uterino inadecuado para el correcto desarrollo del embrión (Albihn *et al.*, 1989). Así mismo, se han utilizado diversos tratamientos que buscan disminuir la mortalidad embrionaria y así incrementar la fertilidad en los hatos, sin embargo, los resultados han sido inconsistentes.

Por otra parte, desde hace algunos años se encuentra disponible comercialmente la somatotropina bovina recombinante (rbST), para incrementar la producción láctea de vacas lecheras, (Bauman, 1992). Con la administración de rbST se incrementan los niveles, en sangre y en diversos fluidos y tejidos corporales, del factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I) (Lefebvre y Block, 1992; Gong *et al.*, 1993^A), el cual representa el mediador de muchas de las acciones de la somatotropina (Hill, 1989).

El IGF-I es mitogénico *per se* (McCusker, 1998) y, además, potencializa a otros factores de crecimiento con mayor actividad mitogénica (Corps y Brown, 1988; Simmen *et al.*, 1993) y, al interactuar con gonadotropinas, estimula la diferenciación celular y la esteroidogénesis (Spicer *et al.*, 1993).

El líquido folicular contiene una gran concentración de IGF-I, especialmente en el folículo preovulatorio (Spicer y Enright, 1991; Yuan *et al.*, 1998), el IGF-I participa en la maduración del óvulo y la ovulación (Hill, 1989), además de

incrementar los receptores para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985).

El cuerpo lúteo de los bovinos presenta una gran cantidad de receptores para somatotropina (Lucy *et al.*, 1993; Yuan y Lucy, 1996) y tratamientos con rbST han logrado aumentar las concentraciones de progesterona circulante en algunos estudios (Schem *et al.*, 1990; Gallo y Block, 1991).

Se ha demostrado la presencia de IGF-I tanto en el líquido oviductal (Schmidt *et al.*, 1994; Makarevich y Sirotkin, 1997) como uterino (Lucy *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1998) así como de receptores para IGF-I (Watson *et al.*, 1992) en el embrión bovino. A su vez, algunos investigadores han establecido el efecto benéfico de la adición de IGF-I, solo o junto otros factores de crecimiento, sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro* (Matsui *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 1997; Rieger *et al.*, 1998).

Por otra parte, se han realizado algunos estudios en nuestro laboratorio (Morales, 1993; Rodríguez, 1999; Mendoza, 2000) donde se ha evaluado el efecto de la administración de rbST sobre la fertilidad y las concentraciones de progesterona de vacas Holstein.

Morales (1993) aplicó 500 mg de rbST el día del estro y una segunda dosis 10 días después y mejoró en 10.57% el índice de concepción de vacas Holstein repetidoras, obteniendo 36.59% en las vacas tratadas y 26.02% en las testigo ($p < 0.05$). A su vez, se provocó un aumento marginal en los niveles de progesterona sérica. Por su parte, Rodríguez (1999) igualmente administró dos dosis de rbST pero esta vez fue con 14 días de diferencia, además de que las aplicó al día 3 y al 17 post-inseminación artificial tanto de vacas de primer servicio como repetidoras (≥ 4 servicios). Sin embargo, no se encontró efecto en la fertilidad obtenida por las vacas de primer servicio (42.1% y 40.2%), por las repetidoras (40.4% y 40.9%) ni en los niveles de progesterona de ambos tipos de animales. Por último, Mendoza (2000) volvió a aplicar la rbST el día del estro tanto de vacas de primer servicio como de vacas repetidoras pero con la diferencia de que no

repitió la dosis, encontrando diferencia estadística en las vacas repetidoras (46.2% y 34.9%) pero no en las vacas de primer servicio (39.7% y 34.8%) ni en los niveles de progesterona.

Sin embargo, a pesar de los resultados anteriores, se desconocen los mecanismos por los cuales fueron logrados. En dichos estudios fueron propuestas, entre otras teorías, que la rbST es capaz de favorecer la ovulación, la función lútea y el desarrollo embrionario en los bovinos.

El objetivo del presente trabajo fue el determinar el efecto de un tratamiento corto de rbST aplicado al inicio del estro sobre algunas funciones reproductivas, tales como las características del folículo ovulatorio, momento de ovulación, niveles hormonales y desarrollo embrionario en hembras Holstein en diferente condición metabólica, que permita un mejor conocimiento de su mecanismo de acción y su potencial uso reproductivo.

Capítulo 2.

Revisión de literatura

2.1 Mortalidad embrionaria temprana

Los problemas reproductivos, en especial la infertilidad, continúan siendo la principal causa de desecho en los hatos lecheros, en donde provoca la eliminación de alrededor del 20% de las vacas, contra un 15% correspondiente a problemas de ubre y un 14% a baja producción (Bascom y Young, 1998).

En ganado bovino, diversos estudios reportan altos índices de fertilización. En vaquillas vírgenes Diskin y Sreenan (1980) encontraron hasta 90% de óvulos fertilizados, Gustafsson (1985) encontró un 82%, Linares (1982) un 97% y Maurer y Chenault (1983) un 80%. En vaquillas infértiles Gustafsson (1985) reporta 70% y Linares (1982) 89%. En vacas adultas se menciona hasta un 100% de fertilización (Maurer y Chenault, 1983). Gustafsson (1985), al sacrificar vaquillas de las cuales repetidamente no obtuvo embriones a los 7 días, encontró a los 3 días post-servicio embriones con retardo en su desarrollo y sugirió que estos embriones retrasados posiblemente sufren desintegración subsecuente y por ello no hay colección a los 7 días, por lo que los índices de fertilización podrían ser todavía más altos.

Si estos porcentajes de fertilización son comparados con los índices de concepción obtenidos en los hatos (30-60%) queda claro que la mortalidad embrionaria es la principal falla reproductiva en los bovinos, afectando en mayor medida a las hembras infértiles (Ayalon, 1981; Linares, 1982; Gustafsson, 1985; Albihn *et al.*, 1989; Roberts, 1990).

Por definición, la mortalidad embrionaria es la pérdida del concepto en cualquier momento antes de completar su etapa de diferenciación celular, la cual ocurre aproximadamente a los 45 días (Committee on Reproductive Nomenclature,

1972).

La mayor parte de dicha mortalidad ocurre dentro de las tres semanas posteriores al servicio (mortalidad embrionaria temprana; Roberts, 1990), por lo que la secuencia normal de eventos luteolíticos no es afectada y las hembras retornan a estro en un periodo similar a un ciclo estral sin gestación (Albihn *et al.*, 1989).

Algunos investigadores han comparado el desarrollo embrionario de vaquillas y vacas tanto normales como repetidoras. Respecto a éstas últimas debe recordarse que la definición clásica establece que son aquellas con por lo menos tres servicios infructuosos previos, sin anomalías detectables a la palpación rectal y con intervalos entre servicios regulares (Tanabe y Casida, 1949). El porcentaje aceptado de vacas repetidoras es de menos de 10% del hato (Gaines, 1989) aunque frecuentemente son alcanzadas incidencias del 25% o mayores (Bartlett, 1986; Torres y Valencia, 1995).

De este modo, Linares (1982) recuperó embriones de 7 días de vaquillas vírgenes y repetidoras, encontrando más embriones normales en las vaquillas vírgenes que en las repetidoras (74% contra 27.5%), el resto correspondió a embriones con anomalías de desarrollo (13% contra 35%) y degenerados (13% contra 37.5%). Cuando analizó el número de células por embrión halló que los blastocistos normales contienen un mayor número de células por embrión que los morfológicamente anormales, tanto en vaquillas vírgenes como en repetidoras. Al comparar embriones de similar clasificación entre grupos no encontró diferencia en el número de células.

En otro estudio similar, Gustafsson (1985) recuperó embriones de 7 días de de edad en ciclos consecutivos de vaquillas vírgenes y repetidoras, reportando porcentajes de embriones normales de 56% contra 30% y porcentaje de embriones morfológicamente desviados de 11 % contra 38% en dos ciclos consecutivos. Más embriones alcanzaron la etapa de blastocisto en las vaquillas vírgenes que en las repetidoras (47% contra 24%), concluyendo que el grado de retardo difiere entre

animales y entre diferentes ciclos del mismo animal.

A su vez, Peterson *et al.* (1999) también recuperaron embriones de vacas fértiles e infértiles pero lo hicieron a los 12 días post-inseminación, encontrando dentro de los embriones viables, un mayor porcentaje de elongados en el grupo fértil (66% contra 14.29%), así como un porcentaje similar de embriones degenerados para ese día.

Por otra parte, se sabe que la principal sustancia embrionaria responsable del reconocimiento materno de la gestación en la vaca y que desencadena la cascada de eventos antiluteolíticos la constituye el interferón tau (Roberts *et al.*, 1992; Thatcher *et al.*, 1997).

El tamaño del embrión es vital para su supervivencia ya que la secreción de interferón tau es dependiente del mismo. En un estudio, Geisert *et al.* (1988^A) solo detectaron secreción de dicha sustancia en embriones que medían más de 25 mm a los días 15-17 post-inseminación, mientras que Thatcher *et al.* (1989) mencionan un tamaño mínimo de 15 mm a los mismos días, que es cuando el reconocimiento de gestación debe realizarse.

Con respecto a la causalidad de la mortalidad embrionaria se han postulado un gran número de factores, los cuales a menudo interactúan entre ellos en detrimento de los embriones. Entre dichos factores se encuentran, principalmente, los genéticos, nutricionales, ambientales, infecciosos y hormonales (Ayalon, 1978; Ayalon, 1981; Zavy, 1994).

Un caso especial lo constituye la presencia de un ambiente oviductal y/o uterino inadecuado, el cual puede actuar de una manera bivalente, ya que lo mismo puede manifestarse como un efecto de algunas de las causas mencionadas con anterioridad o bien puede constituir una causa por sí mismo. A este respecto debe recordarse que el desarrollo embrionario es el resultado de delicadas interacciones entre el programa genético de cada embrión y el aparato genital materno, involucrando en el periodo inicial de proliferación y diferenciación celular algunos factores autocrinos, en su mayoría factores de crecimiento generados por

el embrión para sostener su propio desarrollo; paracrinos, factores de crecimiento y proteínas específicas producidas por el oviducto y útero; y ambientales, como sustratos energéticos, iones, aminoácidos y vitaminas, los cuales, en su conjunto establecen el medio adecuado para la viabilidad del embrión (Gandolfi, 1994).

En un estudio diseñado para evaluar los efectos del ambiente uterino, Albiñ *et al.* (1989) transfirieron embriones de 7 días divididos por bipartición y provenientes de vaquillas normales a vaquillas vírgenes y repetidoras y los recuperaron 8 días después, obteniendo el doble de embriones elongados en las vaquillas vírgenes. Además, los embriones elongados transferidos a las vaquillas repetidoras mostraron una morfología anormal, por lo que concluyeron que el ambiente uterino en las vaquillas repetidoras es menos adecuado que en las vírgenes para sostener un desarrollo embrionario normal.

Con respecto a los factores genéticos, es comunmente aceptado que la mortalidad embrionaria que provocan constituye un método de selección natural efectivo para acabar con la gestación, en una etapa inicial, de productos cromosómicamente anormales (Zavy, 1994). Dichos factores pueden dividirse, por un lado, en aquellos que son heredados de padres con anomalías genéticas y por otro lado, en mutaciones o anomalías cromosómicas que ocurren espontáneamente durante la gametogénesis, fertilización o embriogénesis (King, 1990).

Ejemplos de los primeros serían la translocación Robersoniana 1/29 (Schmutz *et al.*, 1991; Kawarsky *et al.*, 1996), 7/21 (Geshi *et al.*, 1994) y 14/20 (McFeely *et al.*, 1993; Schmutz *et al.*, 1997) así como la falta de expresión del gen encargado de la producción de la uridin-5'-monofosfato sintetasa, lo que provoca que los niveles de ésta se encuentren a menos de la mitad de lo normal (Harden y Robinson, 1987; Shanks y Robinson, 1989). A su vez, un ejemplo de los segundos lo constituye la poliespermia originada por la fertilización de un óvulo envejecido (Hunter, 1985). Las condiciones anteriores son responsables de una gran proporción de la mortalidad embrionaria. A este respecto, De Almeida (1995)

estima que el 20% de los embriones bovinos están destinados a morir debido a problemas genéticos.

Con respecto a los factores nutricionales, el caso más estudiado lo constituye el exceso de proteína degradable en rumen en la dieta, ya sea en términos absolutos o bien relativos con respecto a los carbohidratos de la misma.

Se ha demostrado una relación entre niveles elevados de nitrógeno ureico circulante con bajos índices de concepción (Blanchard *et al.*, 1990; Ferguson *et al.*, 1993; Butler *et al.*, 1996). Se ha postulado que niveles elevados de amoníaco y urea en sangre pueden provocar niveles similares en tejidos y fluidos del tracto reproductivo, los cuales serían tóxicos para el embrión o bien, pueden dañar a las células ciliadas, resultando en un deficiente transporte del mismo (Carroll *et al.*, 1988). A su vez, se ha determinado que las altas concentraciones de amoníaco y urea provocan una disminución del pH uterino, lo que resultaría en una mayor mortalidad embrionaria (Elrod *et al.*, 1993; Elrod y Butler, 1993), además de alterar las concentraciones de iones (Mg, K, P y Zn) y de proteínas en el tracto reproductivo (Jordan *et al.*, 1983). Por su parte, Jordan y Swanson (1979^A, 1979^B) detectaron que las dietas altas en proteína resultan en una disminución de la concentración de progesterona sérica, quizás debido a que la urea inhibe el enlace de la hormona luteinizante a sus receptores a nivel ovárico (Haour y Saxena, 1974). Lo anterior ejemplifica claramente la interacción entre diferentes agentes causales de mortalidad embrionaria, es decir, como una causa en particular puede tener un efecto directo sobre el embrión (toxicidad del amoníaco y urea) así como indirecto, al modificar el ambiente uterino y las concentraciones de progesterona vitales para el desarrollo normal del embrión.

Otro factor nutricional se refiere al nivel de glucosa circulante, cuyos niveles deprimidos están asociados a un pobre índice de concepción en algunos trabajos (McClure, 1968; McClure, 1970; Plym *et al.*, 1991) quizás mediado por una menor concentración de progesterona circulante (Villa-Godoy *et al.*, 1988).

Dentro de las causas ambientales, la hipertermia es el factor que afecta en

mayor medida la viabilidad de los embriones bovinos. Dicha condición puede actuar directamente sobre el embrión al elevarse la temperatura oviductal/uterina o bien, indirectamente al modificar el equilibrio hormonal materno lo cual ocasiona cambios a los mismos niveles (Zavy, 1994). Con respecto a lo anterior, Malayer y Hansen (1990) demostraron que el patrón de síntesis proteica en oviducto y útero cambia en vacas sometidas a hipertermia, y Geisert *et al.* (1988^B) reportan que el líquido uterino contiene una mayor cantidad de proteínas y calcio en vacas sometidas a stres térmico.

Putney *et al.* (1986) encontraron un 25% más de embriones retrasados en su desarrollo en vaquillas sometidas a estrés calórico que en vaquillas testigo y, en un segundo trabajo (Putney *et al.*, 1988^A), colectaron embriones de vaquillas superovuladas, reportando, al día 7, solo un 20.7% de embriones normales contra 51.5% del grupo testigo. En adición, estudios *in vitro* han demostrado que la hipertermia deprime la síntesis proteica del concepto, incluyendo una disminución del 72% en la producción de interferón tau (Putney *et al.*, 1988^B).

Por otra parte, existe una amplia variedad de agentes infecciosos capaces de provocar muerte embrionaria, la cual incluye diversas bacterias, virus, protozoarios y hongos.

Entre las principales causas bacterianas de mortalidad embrionaria se encuentran el *Actinomyces pyogenes* (Semambo *et al.*, 1991), el *Campylobacter fetus* (Adler, 1959) y el *Ureaplasma diversum* (Ruhnke *et al.*, 1989), los cuales, más que afectar directamente al embrión, provocan una infección del tracto reproductivo, lo que lo hace menos propicio para el correcto desarrollo embrionario. El *Haemophilus somnus*, en cambio, ha probado tener un efecto directo sobre el embrión (Kaneene *et al.*, 1986), mientras que la *Leptospira interrogans* (serovariedad hardjo y pomona, principalmente) es causante de infertilidad y puede permanecer en oviducto por más de tres meses (Ellis y Thiermann, 1986) por lo que ha sido implicada en la mortalidad embrionaria.

Los principales virus causantes de mortalidad embrionaria son el Herpes

virus bovino-I (Bowen *et al.*, 1985), el cual tiene un efecto directo sobre el embrión, y el virus de la diarrea viral bovina que provoca una endometritis y por consiguiente un ambiente uterino desfavorable para el embrión (Donis *et al.*, 1988).

El principal protozooario implicado en la mortalidad embrionaria lo constituye la *Tritrichomonas foetus*, la cual está asociada a una infección purulenta del tracto reproductivo (Skirrow y Bondurant, 1990).

Candida tropicallis y *Acremonian kiliense* son dos hongos a los cuales se les ha atribuido un efecto negativo sobre el embrión (Corbel, 1988), sin embargo, la cantidad de información al respecto es muy limitada.

Con respecto a los agentes infecciosos como causantes de mortalidad embrionaria, debe recordarse que los elevados niveles de progesterona, propios de la gestación, constituyen un factor predisponente para la acción de los microorganismos, debido a que dichos niveles tienen un efecto inmunodepresor, el cual incluye un retraso en la infiltración leucocitaria al útero (Hawk *et al.*, 1964) y la inhibición tanto de la proliferación de linfocitos (Fisher *et al.*, 1985) como de la capacidad de opsonización de las secreciones uterinas (Watson, 1985). En adición, se ha demostrado que diversas sustancias embrionarias, como la PGE₂ (Low y Hansen, 1988), son capaces de deprimir la proliferación linfocitaria (Croy *et al.*, 1988), mecanismos que, en su conjunto, han sido propuestos como permisivos del establecimiento de la gestación (Zavy, 1994).

Por otra parte, dentro de las causas hormonales se ha señalado como la principal a la deficiente función del cuerpo lúteo, lo que se traduce en niveles subnormales de progesterona, que pueden resultar en mortalidad embrionaria (Garverick *et al.*, 1986). Debe recordarse que la progesterona es necesaria para mantener un ambiente uterino adecuado para el desarrollo del embrión (Roberts y Bazer, 1988; Milvae *et al.*, 1996) e incluso hasta ha sido encontrada una correlación positiva entre los niveles de progesterona plasmática materna y la producción embrionaria de interferón tau (Kerbler *et al.*, 1997).

A pesar de dicha dependencia embrionaria de niveles adecuados de

progesterona materna, existe una gran controversia en lo referente a la importancia de estos en la mortalidad embrionaria, ya que mientras algunos autores han encontrado niveles deprimidos en hembras infértiles y/o con embriones anormales en útero (Henricks *et al.*, 1971; Gustafsson, 1986; Kimura *et al.*, 1987; Lamming *et al.*, 1989; Shelton *et al.*, 1990), otros reportan en ellas concentraciones similares a las de las hembras normales (Shemesh *et al.*, 1968; Linares *et al.*, 1982; Sreenan y Diskin, 1983; Taylor y Rajamahendran, 1991; Hernández *et al.*, 1992; Morales *et al.*, 2000). Como la relación entre los niveles deprimidos de progesterona y la infertilidad y/o mortalidad embrionaria es clara en algunos trabajos y no en otros, podría pensarse que la importancia de los niveles deprimidos de dicha hormona como causa de mortalidad embrionaria es variable entre animales con diferente condición metabólica y/o entre hatos en particular, por lo que únicamente podríamos detectarla en animales y hatos en donde es una causa primaria de la misma, pero no en otros en donde habría otras causas con mayor importancia.

A pesar de no haberse clarificado del todo el papel de la progesterona como causante de mortalidad embrionaria, desde hace décadas han sido utilizados diversos tratamientos tendientes a incrementar los niveles de esta hormona para disminuir la mortalidad y así aumentar la fertilidad obtenida.

Entre dichos tratamientos se encuentran la aplicación de progestágenos por diversos periodos post-servicio (Fukuy *et al.*, 1985; Robinson *et al.*, 1989; Walton *et al.*, 1990; MacMillan *et al.*, 1991; Van Cleef *et al.*, 1991) así como el uso de hormonas con acción luteotrópica, como el factor liberador de gonadotropinas (GnRH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) ya sea al momento del servicio (Lee *et al.*, 1983; Phatak *et al.*, 1986; El-Azab *et al.*, 1987; Berger, 1988; Roussel *et al.*, 1988; Young y Swason, 1988; Stevenson *et al.*, 1990; Swason y Young, 1990; Uriostegui, 1990; Bondurant *et al.*, 1991; Rao, 1991; Wagh *et al.*, 1991; Archibald *et al.*, 1993; Humblot y Saumande, 1993; Morales *et al.*, 1998) o bien durante el diestro (Macmillan *et al.*, 1986; Thatcher *et al.*, 1989; Jub *et al.*, 1990; Walton *et al.*, 1990; Rajamahendran y Sianangama, 1992; Sianangama y

Rajamahendran, 1992; Kerbler *et al.*, 1997). Sin embargo, también en estos casos se nota una falta de uniformidad en los resultados, existiendo reportes en donde, tanto las concentraciones de progesterona como la concepción alcanzada por los grupos tratados, supera ampliamente a los testigos y, por otra parte, un número similar de trabajos en donde no hubo efecto alguno, por lo que la conveniencia de dichos tratamientos ha sido cuestionada (Thatcher *et al.*, 1993; Diaz, 1995). Lo anterior reflejaría el efecto del tipo de animal y/o del hato en particular ya mencionado.

2.2 Somatotropina bovina e IGF-I en eventos reproductivos

La somatotropina bovina es producida en la pituitaria anterior y tiene cuatro variantes en su síntesis, es decir, puede tener 190 o 191 aminoácidos y leucina o valina en la posición 126 (Wood *et al.*, 1989).

Además de su vital función en el proceso del crecimiento que da origen a su nombre, desde hace ya más de 60 años es conocido el efecto galactopoiético de la somatotropina (Asimov y Krouze, 1937) por lo que, cuando las técnicas de ingeniería genética lo permitieron, fue desarrollada la somatotropina bovina producida por recombinación genética (rbST), la cual se ha convertido en uno de los productos biotecnológicos de mayor impacto a nivel mundial (Bauman, 1992).

Con la aplicación de la rbST se incrementa la producción láctea en un 10-20% (Peel y Bauman, 1987) sin que se comprometa la salud y los parámetros reproductivos de los hatos (Eppard *et al.*, 1987; Cole *et al.*, 1991; Waterman *et al.*, 1993; Chalupa *et al.*, 1996).

A este respecto, se ha estimado que lograr un aumento en la eficiencia productiva similar a la obtenida con el uso de la rbST tomaría de 10 a 20 años utilizando intensivamente una combinación de técnicas de mejoramiento genético como la inseminación artificial y la transferencia de embriones (Bauman, 1992).

El mecanismo de acción de la rbST como hormona estimulante de la producción láctea continúa sin dilucidarse totalmente pero su efecto principal es el provocar un mayor direccionamiento de los nutrientes hacia la síntesis de leche, por lo que coordina una serie de eventos en diversos tejidos (Peel y Bauman, 1987; Nytes *et al.*, 1990; Bauman, 1992). Dichas acciones pueden ser provocados por la misma rbST o bien por el factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I), el cual representa el mediador de muchas de las acciones de la somatotropina (Hill, 1989), y cuyos niveles séricos se incrementan drásticamente con la aplicación de rbST (Lefebvre y Block, 1992; Lucy *et al.*, 1995), incremento que llega a su máximo después de las 48 horas post-aplicación de la rbST (Gong *et al.*, 1993^B).

El IGF-I así como el IGF-II son polipéptidos con peso molecular de alrededor de 7500 daltons (Hill, 1989), consisten en cadenas de 70 y 67 aminoácidos, respectivamente y tienen similitud estructural con la insulina (McCusker, 1998). Como ejemplo, puede decirse que el IGF-I tiene un 45% de secuencia homóloga con ella (Blundell y Humbell, 1989). El IGF-II, por su parte, es más independiente de la somatotropina y está presente en el suero en grandes concentraciones durante la vida fetal y neonatal (Moses *et al.*, 1980).

La secuencia de aminoácidos del IGF-I es idéntica en el humano, cerdo y bovino (Tavakkol *et al.*, 1988). Así mismo, se sabe que es mitogénico *per se* (Baumrucker y Stemberger, 1989; McCusker, 1998) y, además, potencializa a otros factores de crecimiento con mayor actividad mitogénica como el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Corps y Brown, 1988) y los factores de crecimiento del fibroblasto, ácido y básico (Simmen *et al.*, 1993). En contraste, al interactuar con gonadotropinas, el IGF-I estimula la diferenciación celular y la esteroidogénesis (Spicer *et al.*, 1993; Spicer y Echterkamp, 1995; Lieberman *et al.*, 1996; Spicer y Stewart, 1996; De Moura *et al.*, 1997).

Como es sabido, la naturaleza cíclica del sistema reproductivo femenino se basa en la habilidad de los folículos ováricos de cambiar rápidamente de estructura

y función. Mientras que las gonadotropinas son las principales iniciadoras del desarrollo folicular, los factores de crecimiento tienen un papel permisivo o mediador en esa respuesta (Hill, 1989; Rieger *et al.*, 1990).

De esta manera, el líquido folicular contiene una gran concentración de IGF-I, especialmente el folículo preovulatorio (Spicer y Enright, 1991; Yuan *et al.*, 1998) y participa en la maduración del óvulo y la ovulación (Hill, 1989; Funston *et al.*, 1996). Así mismo, Eden *et al.* (1988) determinaron que existe una alta correlación entre la concentración de IGF-I en el líquido del folículo dominante y la encontrada en el suero.

Un aspecto interesante es la existencia de al menos 7 proteínas de enlace de los IGF's (IGFBP's), las cuales modulan su actividad biológica (Shimasaki y Ling, 1991; Oh *et al.*, 1996). Aunque se desconoce su función exacta, es aceptado que tienen un efecto inhibitorio o dilatorio sobre la actividad de los IGF's, además de servir como proteínas transportadoras, aumentando su vida media en la circulación y en los diferentes tejidos (Jones y Clemmons, 1995; Winger *et al.*, 1997; McCusker, 1998).

Un claro ejemplo de la importancia de dichas proteínas lo constituye la maduración final del folículo dominante en donde las concentraciones intrafoliculares de IGFBP-2, IGFBP-4 e IGFBP-5 disminuyen drásticamente, tanto por un decremento en su síntesis como por un aumento de su degradación por proteinasas específicas, lo que resulta en una mayor biodisponibilidad de IGF-I, el cual amplifica las acciones de las gonadotropinas sobre las células foliculares. En cambio, en los folículos que sufrirán atresia se incrementa la síntesis y disminuye la degradación de las proteínas de enlace (Monniaux *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998).

El IGF-I, sinérgicamente con la hormona folículo estimulante (FSH) incrementa la división y diferenciación de las células de la granulosa (Davoren y Hsueh, 1986; Carson *et al.*, 1989), además de estimular la producción de andrógenos tecales (Hernández *et al.*, 1988), incrementar el número de receptores

para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985), así como estimular la actividad de la aromatasas y la síntesis de estrógenos y progesterona (Adashi *et al.*, 1985; Carson *et al.*, 1989; Sauerwein *et al.*, 1992; Spicer *et al.*, 1993; Spicer y Echtenkamp, 1995; Lieberman *et al.*, 1996).

La FSH aparentemente aumenta la respuesta a IGF-I a través del incremento de la actividad de sus receptores (Adashi *et al.*, 1988^B; Carson *et al.*, 1989) por medio de un mecanismo dependiente de AMP cíclico (Adashi *et al.*, 1988^A), elevándose también esta capacidad ligadora por LH y estrógenos (Adashi *et al.*, 1988^B).

El cuerpo lúteo de los bovinos presenta una gran cantidad de receptores para somatotropina (Lucy *et al.*, 1993; Yuan y Lucy, 1996), principalmente en las células lúteas grandes, a diferencia de las células foliculares donde se localiza solo una pequeña parte de los encontrados en células lúteas (Lucy *et al.*, 1993). Así mismo, tratamientos con rbST han logrado aumentar las concentraciones de progesterona circulante en algunos estudios *in vivo* utilizando vacas lecheras poco después del parto lo que podría ser resultado de un efecto directo de la rbST sobre las células lúteas (Schem *et al.*, 1990; Gallo y Block, 1991).

Por otra parte y como ya fue mencionado, el embrión bovino depende totalmente de las secreciones oviductales y uterinas para su correcto desarrollo, las cuales deben encontrarse en un delicado equilibrio entre sus múltiples y variados componentes (Bavister, 1988; Roberts y Bazer, 1988). A este respecto se ha demostrado la presencia de IGF-I tanto en el líquido oviductal (Schmidt *et al.*, 1994; Makarevich y Sirotkin, 1997) como uterino (Lucy *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1998) así como de receptores para IGF-I, IGF-II, insulina y EGF en el embrión bovino (Schultz *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 1992).

Schultz *et al.* (1992) detectaron receptores para IGF-I en el embrión desde la etapa de una célula y algunos investigadores han establecido el efecto benéfico de la adición de IGF-I, solo o junto con otros factores de crecimiento, sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro* (Matsui *et al.*, 1995; Palma *et*

al., 1995; Gandolfi *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1997). A este respecto, Matsui *et al.* (1995) reportan que el efecto benéfico del IGF-I solo se manifestó hasta la etapa de mórula siendo inexistente durante la transición de mórula a blastocisto.

Por otra parte, se han realizado algunos estudios en nuestro laboratorio (Morales, 1993; Rodríguez, 1999; Mendoza, 2000) donde se ha evaluado el efecto de la administración de rbST sobre la fertilidad y las concentraciones de progesterona de vacas Holstein.

Morales (1993) aplicó 500 mg de rbST el día del estro y una segunda dosis 10 días después y mejoró en 10.57% el índice de concepción de vacas Holstein repetidoras, obteniendo 36.59% en las vacas tratadas y 26.02% en las testigo ($p < 0.05$). A su vez, se provocó un aumento marginal en los niveles de progesterona sérica.

Por su parte, Rodríguez (1999) igualmente administró dos dosis de 500 mg de rbST pero esta vez fue con 14 días de diferencia, además de que las aplicó al día 3 y al 17 post-inseminación artificial tanto de vacas de primer servicio como repetidoras (≥ 4 servicios). Sin embargo, al no encontrar efecto en la fertilidad obtenida por las vacas de primer servicio (42.1% y 40.2%), por las repetidoras (40.4% y 40.9%) ni en los niveles de progesterona de ambos tipos de animales fue determinada la importancia del momento de la primera aplicación.

Por último, Mendoza (2000) volvió a aplicar la rbST el día del estro tanto de vacas de primer servicio como de vacas repetidoras pero con la diferencia de que no repitió la dosis, encontrando diferencia estadística en las vacas repetidoras (46.2% y 34.9%) pero no en las vacas de primer servicio (39.7% y 34.8%) ni en los niveles de progesterona. Dicho trabajo demostró que el efecto observado anteriormente (Morales, 1993) podía ser obtenido con una sola aplicación de rbST.

En adición, se han realizado algunos estudios en donde se ha administrado rbST pocos días antes o junto con un tratamiento superovulatorio y ha sido encontrado un efecto positivo sobre el número de embriones obtenidos y/o la calidad de estos. Así, Rieger *et al.* (1990) aplicaron 20 mg de rbST junto con cada

inyección de FSH en vaquillas y lograron aumentar el número de embriones totales (9 ± 3.6 contra 6.4 ± 7.8). En cambio, el número de embriones transferibles (5.6 ± 3.4 contra 4.7 ± 5.5) y la concentración de progesterona al día 6 (14.8 ± 4.6 contra 11.9 ± 3.4 ng/ml) no fueron diferentes.

Herrler *et al.* (1990) aplicaron 640 mg de rbST en un vehículo de liberación lenta 5 días antes de aplicar gonadotropina coriónica equina (eCG) a vacas Holstein con 80.7 días post-parto y, a pesar de una clara tendencia en cuanto al total de embriones (4.5 contra 2.2) y embriones transferibles (3.8 contra 1.9), no alcanzó diferencia estadística.

En un segundo trabajo Rieger *et al.* (1991) aplicaron 20 mg de rbST con cada aplicación de FSH en vaquillas y no encontraron diferencias en el número total de embriones (8.3 contra 7.2) ni en embriones transferibles (5.2 contra 5.3), sin embargo, si la hallaron tanto en el porcentaje de embriones transferibles (58.8% contra 76.5%) a favor del grupo testigo y en los niveles de progesterona plasmática al día 6 a favor de los animales tratados.

Gong *et al.* (1993^B) aplicaron 320 mg de rbST (liberación prolongada) 5 días antes de eCG y aumentaron el número de embriones totales (7.1 contra 4.1) pero disminuyó el porcentaje de embriones transferibles en vaquillas (67.9% contra 90.6%), además, los niveles plasmáticos de progesterona, ST, IGF-I e insulina fueron aumentados.

Por su parte, Gray *et al.* (1993) administraron 25 mg de rbST diariamente por un largo periodo (37 días) antes de provocar la superovulación con FSH en vacas lactantes y no lactantes sin lograr efectos benéficos en el número total de embriones (8.4 contra 7.1) ni en el número de embriones transferibles (1.9 contra 3.6).

Kuehner *et al.* (1993) inyectaron 500 mg de rbST (liberación prolongada) a vaquillas de 18 a 43 meses superovuladas con FSH y encontraron diferencia en el porcentaje de embriones transferibles en los animales tratados 7 días antes de iniciar con FSH y las vaquillas testigo (74.6% contra 58.6%). La progesterona fue

similar entre grupos y la ST e IGF-I mayor en los animales tratados.

Herrler *et al.* (1994) utilizaron vacas lecheras de 2-8 años con 83.8 días post-parto y les aplicaron 640 mg de rbST (liberación lenta), encontrando un mayor número y un mayor porcentaje de embriones transferibles en los animales tratados 5 días antes de eCG (4.2 ± 1 y 95.7% contra $2.5 \pm .7$ y 77.7%).

Por último, Gong *et al.* (1995; 1996) aplicaron 320 mg de rbST (liberación prolongada) 5 días antes de FSH a vaquillas de carne, lo cual repitieron con los mismos animales en tres ocasiones con intervalos de 3 meses y reportan un mayor número de óvulos y embriones (11.8 ± 2.5 y 6 ± 2.1 ; 5.8 ± 1.7 y 3.2 ± 1.3 ; 7.2 ± 1.9 y 3.7 ± 1.1), número de embriones transferibles (10.8 ± 1.9 y 5 ± 2.3 ; 5.7 ± 1.6 y 1.5 ± 0.3 ; 6.3 ± 1.8 y 2.6 ± 0.7), un mayor porcentaje de embriones transferibles (91.5% y 83.3%; 98.3% y 46.9%; 87.5% y 70.3%) y un aumento en los niveles séricos de ST, IGF-I e insulina.

Capítulo 3.

Efecto de la administración de rbST al inicio del estro sobre el diámetro del folículo ovulatorio, concentraciones de estradiol, momento de la ovulación y función del cuerpo lúteo de vaquillas Holstein.

Resumen

Con el objetivo de determinar el efecto de la administración de somatotropina bovina recombinante (rbST), al inicio del estro, sobre eventos ováricos periovulatorios de vaquillas Holstein, se sincronizaron 19 vaquillas con dos dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y luego se dividieron aleatoriamente en dos grupos: Grupo rbST (n=11) a las que se les inyectó subcutáneamente 500 mg de rbST al inicio del estro sincronizado y Grupo testigo (n=8) a las que se les aplicó 1.4 ml de solución salina. Se determinaron y compararon las concentraciones plasmáticas de estradiol 17β a las 0, 8, 16 y 24 horas post-inicio del estro, el diámetro máximo del folículo ovulatorio, el intervalo inicio del estro-ovulación y el diámetro del cuerpo lúteo al día 7 y 10 post-estro, lo anterior con un equipo de ultrasonido de tiempo real. Se compararon las concentraciones diarias de progesterona plasmática del día del estro (día 0) hasta el día 10. El diámetro máximo del folículo ovulatorio fue de 16.0 ± 0.47 mm y 15.1 ± 0.51 mm, el intervalo inicio del estro-ovulación fue de 27.1 ± 1.1 y 27.8 ± 1.2 horas, el diámetro del cuerpo lúteo al día 7 fue de 24.0 ± 1.2 mm y 24.8 ± 1.4 mm y al día 10 de 26.6 ± 1.1 mm y 26.1 ± 1.3 mm, para el grupo tratado con rbST y el testigo, respectivamente, sin que se detectaran diferencias ($P > 0.05$) en ninguno de los casos. Las concentraciones de estradiol 17β y progesterona tampoco difirieron ($P > 0.05$) entre grupos. Se concluye que la administración de 500 mg de rbST al inicio del estro de vaquillas Holstein no afecta el desarrollo final del folículo ovulatorio, la ovulación ni el desarrollo del cuerpo lúteo.

Palabras clave: rbST, SOMATOTROPINA, OVULACION, CUERPO LUTEO.

Introducción

La somatotropina bovina producida por recombinación genética (rbST) ha mostrado su acción galactopoiética en un amplio rango de condiciones experimentales (Bauman, 1992; Cunningham, 1994). Con la administración de rbST se incrementan drásticamente los niveles del factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I) en sangre y en diversos fluidos y tejidos corporales, (Lefebvre y Block, 1992; Gong *et al.*, 1993^A; Lucy *et al.*, 1995). Este factor representa el mediador de muchas de las acciones de la somatotropina (Giudice, 1992; Hill, 1989).

El IGF-I es mitogénico *per se* (McCusker, 1998) y, además, potencializa a otros factores de crecimiento con mayor actividad mitogénica (Corps y Brown, 1988, Simmen *et al.*, 1993). En el folículo ovárico, el IGF-I, al interactuar con gonadotropinas, estimula la diferenciación celular y la esteroidogénesis (Spicer *et al.*, 1993; Spicer y Echterkamp, 1995; De Moura *et al.*, 1997).

El líquido folicular contiene una gran concentración de IGF-I, especialmente en el folículo preovulatorio (Spicer y Enright, 1991; Yuan *et al.*, 1998), el IGF-I participa en la maduración del óvulo y la ovulación (Hill, 1989), además de incrementar los receptores para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985).

El cuerpo lúteo de los bovinos presenta una gran cantidad de receptores para somatotropina (Lucy *et al.*, 1993; Yuan y Lucy, 1996) y con algunos tratamientos con rbST se ha logrado aumentar las concentraciones de progesterona circulante en algunos estudios (Schem *et al.* 1990; Gallo y Block, 1991).

En un estudio previo de nuestro laboratorio (Morales, 1993), la administración de 500 mg de rbST el día del estro y una segunda dosis 10 días después provocó un aumento marginal en los niveles de progesterona sérica de vacas Holstein repetidoras. En dicho estudio se propuso que, dadas las funciones

de la somatotropina y el IGF-I, la rbST podría influir en las características del folículo ovulatorio, en la ovulación misma o bien en el desarrollo y función del cuerpo lúteo.

El objetivo del presente trabajo fue el de determinar el efecto de la rbST aplicado al inicio del estro sobre algunas funciones reproductivas de vaquillas Holstein, animales en donde la lactación no constituye un factor involucrado con la respuesta.

Material y métodos

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, en Topilejo, D.F. Dicho centro es dependiente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y se localiza en las coordenadas 19°3' de latitud Norte y 99°8' de longitud Oeste, a una altura de 2760 msnm. El clima de la región es c(w)(w)b(ij) semifrío semihúmedo con lluvias en verano, alcanzando una precipitación pluvial anual de 800-1200 mm (García, 1973).

Se utilizaron 19 vaquillas Holstein las cuales se sincronizaron con dos inyecciones de 25 mg de dinoprost (Lutalyse, Upjohn México) con 11 días de intervalo.

Los animales fueron sometidos a una detección continua de estros después de la segunda inyección de dinoprost y el inicio del estro fue determinado. En ese momento las vaquillas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: Grupo rbST (n=11) a las que se les aplicó una dosis subcutánea de 500 mg de rbST (Lactotropina, Elanco México) en la fosa isquiorectal derecha y Grupo testigo (n=8) las cuales recibieron 1.4 ml de solución salina fisiológica (Laboratorios PISA, México) por la misma vía.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de cada animal inmediatamente antes de la aplicación de los tratamientos, así como 8, 16 y 24 horas después. Las

muestras se obtuvieron en tubos heparinizados mediante punción de la vena o arteria coccígea. El plasma se separó inmediatamente por centrifugación y se mantuvo congelado a -20°C hasta la determinación de estradiol 17β por medio de radioinmunoensayo en fase sólida (Fortune y Quirk, 1988). La sensibilidad del método fue de 0.156 pg/ml, con un coeficiente de variación intra e interensayo para la dosis baja de 5.36% y 6.26%, respectivamente, mientras que para la dosis alta correspondió a 0.84% y 2.74%.

A partir de las 24 horas después del inicio del estro, los animales fueron revisados ultrasonográficamente (Aloka 210 con transductor de 5 MHz) cada tres horas y hasta que la ovulación se produjo con la finalidad de establecer tanto el diámetro máximo del folículo ovulatorio como el intervalo inicio del estro-ovulación. La hora de ovulación se calculó como la mitad del tiempo entre la última revisión antes de la ovulación y la primera en donde ya había ocurrido. Adicionalmente fueron hechas mediciones ultrasonográficas al día 7 y 10 post-estro para determinar el diámetro del cuerpo lúteo.

Entre el día del estro (día 0) y el día 10 fueron tomadas muestras sanguíneas para la determinación de progesterona plasmática por la técnica de radioinmunoensayo en fase sólida (Pulido *et al.*, 1991) a partir del día del estro (día 0) y hasta el día 10. La sensibilidad del método fue de 0.15 ng/ml, con un coeficiente de variación intra e interensayo para la dosis baja de 3.4% y 9.81%, respectivamente, mientras que para la dosis alta correspondió a 5.64% y 7.37%.

Se compararon, por medio de una prueba de t de Student (Gill, 1978) el diámetro máximo del folículo ovulatorio, el intervalo inicio del estro-ovulación y el diámetro del cuerpo lúteo al día 7 y 10.

Las concentraciones de estradiol 17β y progesterona fueron comparadas con un análisis de varianza para mediciones repetidas, utilizando para ello el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (Littell *et al.*, 1998) y, además, mediante una comparación de áreas bajo la curva con una prueba de t de Student (Gill, 1978).

Resultados

El intervalo inicio del estro-ovulación fue de 27.1 ± 1.1 h para el grupo rbST y 27.8 ± 1.2 h para el testigo, sin que hubiera diferencia entre ellos ($P>0.05$).

El diámetro máximo del folículo ovulatorio fue de 16.0 ± 0.47 mm y 15.1 ± 0.51 mm, el diámetro del cuerpo lúteo al día 7 de 24.0 ± 1.2 mm y 24.8 ± 1.4 mm y al día 10 de 26.6 ± 1.1 mm y 26.1 ± 1.3 mm, para el grupo rbST y testigo, respectivamente, sin encontrarse diferencia en ninguno de los casos ($P>0.05$).

En lo que respecta a las concentraciones plasmáticas de estradiol 17β y progesterona, éstas fueron similares ($P>0.05$) entre grupos (Cuadro y Figura 1).

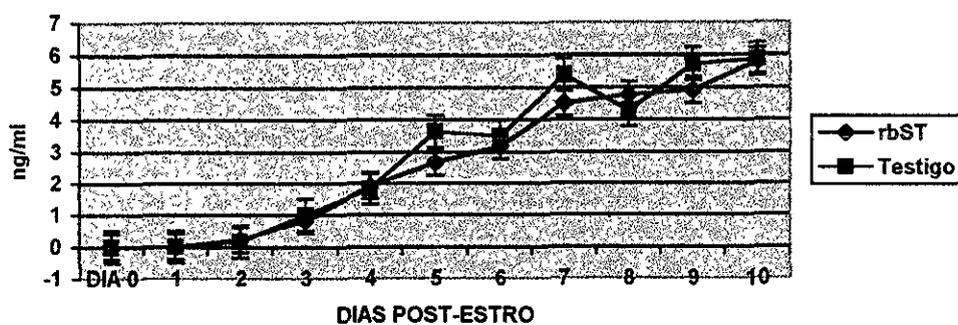
El área bajo la curva de estradiol 17β correspondió a 27.47 ± 4.58 pg/ml en el grupo rbST y a 27.93 ± 4.94 pg/ml en el testigo, mientras que en el caso de la progesterona ésta fue de 28.83 ± 2.09 y 31.41 ± 2.7 , respectivamente, sin diferencia entre grupos ($P>0.05$).

CUADRO 3.1.
CONCENTRACIONES DE ESTRADIOL 17 β PLASMÁTICO (pg/ml) EN
VAQUILLAS HOLSTEIN TRATADAS CON 500 mg DE rbST AL INICIO DEL
ESTRO Y EN VAQUILLAS TESTIGO (MEDIA \pm ERROR ESTANDAR).

HORAS POST-INICIO DEL ESTRO	G R U P O	
	rbST	TESTIGO
0	3.71 \pm 2.08	9.67 \pm 2.25
8	12.18 \pm 2.08	9.06 \pm 2.25
16	6.29 \pm 2.08	5.50 \pm 2.25
24	5.29 \pm 2.08	3.71 \pm 2.25

No se observó diferencia estadística entre grupos (P>0.05).

FIGURA 3.1.
PROGESTERONA PLASMÁTICA (ng/ml) DE VAQUILLAS HOLSTEIN
TRATADAS CON 500 mg DE rbST AL INICIO DEL ESTRO Y VAQUILLAS
TESTIGO.



No se observó diferencia estadística entre grupos ($P > 0.05$).

Discusión.

El tratamiento no modificó el intervalo inicio del estro-ovulación y no existen reportes de tal parámetro en hembras tratadas con rbST. Aunque sí se sabe que el IGF-I participa en la maduración del óvulo y la ovulación (Hill, 1989), además de incrementar los receptores para LH en las células de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985), en el presente trabajo la aplicación de la rbST al inicio del estro en vaquillas no modificó el diámetro máximo del folículo ovulatorio, el intervalo a la ovulación ni la secreción de estradiol 17β . Sin embargo, es posible que el tratamiento haya sido aplicado demasiado cerca de la ovulación como para poder afectarla, sobre todo si se piensa que un eventual efecto sería mediado por IGF-I, ya que el folículo tiene escasos receptores para ST (Lucy *et al.*, 1993). Se debe tomar en cuenta que los niveles elevados de IGF-I se alcanzan hasta las 48 horas después de aplicar la rbST (Gong *et al.*, 1993). También existe la posibilidad de que el momento de la ovulación no sea un acontecimiento que pueda variar dramáticamente en vaquillas (Hernández-Cerón *et al.*, 1993) aún en animales tratados.

Sin embargo, en algunos estudios en los que la rbST se aplicó con mayor anticipación con relación a la ovulación tampoco se ha encontrado un efecto de la rbST sobre el desarrollo y función folicular.

Kirby *et al.* (1997^A) reportan que el diámetro máximo del folículo ovulatorio no difirió entre grupos, con 16.4 ± 0.6 mm en vacas tratadas y 16.1 ± 0.6 mm en las testigo. En otro estudio similar (Kirby *et al.*, 1997^B), el mismo grupo de investigadores encontró 18.7 ± 1.2 mm y 18.5 ± 1.1 mm, respectivamente.

Por su parte, las concentraciones preovulatorias de estradiol tampoco fueron afectadas por el tratamiento. Kirby *et al.* (1997^A) informa similares resultados al igual que Schem *et al.* (1990). Lo anterior a pesar de que Spicer *et al.* (1993) encontraron que el IGF-I estimula la producción de estradiol por los folículos grandes *in vitro* y que Campbell *et al.* (1993) lograron incrementar los niveles de estradiol *in vivo* al infundir un análogo del IGF-I. El tiempo requerido para

establecer una respuesta mediada por IGF-I también es aplicable en este caso, ya que, como fue señalado, los niveles de IGF-I se incrementan en forma significativa 48 horas post-aplicación de rbST (Gong *et al.*, 1993^A).

En el presente trabajo tampoco se encontró un efecto de la rbST sobre el desarrollo y función del cuerpo lúteo de vaquillas Holstein, ya que el diámetro del cuerpo lúteo fue similar entre grupos tanto al día 7 como al 10. Lucy *et al.* (1994^A) tampoco encontraron diferencia en el área lútea en los días 4-21 post-estro de vaquillas pero sí en otro estudio (Lucy *et al.*, 1994^B) donde observaron una mayor área en los días 0 a 10 y 15 a 21, también en vaquillas, así como un mayor peso del cuerpo lúteo al día 17 de vacas (Lucy *et al.*, 1995).

Las concentraciones de progesterona tampoco difirieron entre grupos en el presente trabajo. Esto coincide con otros estudios tanto en vaquillas (Gong *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1993^A; Lucy *et al.*, 1994^A) como en vacas (Dalton y Marcinkowski, 1994; Lucy *et al.*, 1995; Kirby *et al.*, 1997^A). Sin embargo, en algunos trabajos (Schemm *et al.*, 1990; Gallo y Block, 1991) se ha observado un incremento en los niveles de progesterona a lo largo de los dos ciclos estrales siguientes al tratamiento de vacas no gestantes; sin embargo, dicho aumento podría ser resultado de una interacción con los días post-parto ya que en el trabajo de Schemm *et al.* (1990) el tratamiento fue iniciado a los 35 o a los 70 días y solo encontró diferencia en el primero de los casos. En el caso de Gallo y Block (1991) la rbST se empezó a administrar a partir del día 29 post-parto, esto sugiere que el efecto de la rbST sobre la función del cuerpo lúteo se presentaría principalmente en vacas que se encontrarían alrededor de los 30 días post-parto.

Es conocido que la ST e IGF-I tienen actividad esteroidogénica (Spicer *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 1994; Lieberman y Schams, 1994; Spicer y Echtenkamp, 1995; De Moura *et al.*, 1997), que poco después del parto los niveles de IGF-I se encuentran deprimidos en respuesta al balance energético negativo (Spicer *et al.*, 1990) y que la aplicación de rbST en ese periodo incrementa dichos niveles (De Boer y Kennelly, 1990) lo que podría reflejarse en el citado aumento en la

concentración de progesterona. Sin embargo, tal capacidad esteroideogénica tendría mecanismos de autoregulación ya que al avanzar el periodo post-parto se recupera el balance energético, con la consiguiente elevación de los niveles de IGF-I, por lo que a pesar de que el tratamiento con rbST aún provoque un aumento en los niveles de IGF-I, este aumento ya no sea necesario para aumentar la función lútea. En el caso del trabajo de Morales (1993) en donde se observó un aumento marginal de la progesterona quizás pueda ser explicado con el hecho de que fueron utilizadas vacas repetidoras, animales donde la incidencia de disfunciones lúteas es mayor (Kimura *et al.*, 1987) por lo que posiblemente los niveles aumentados de rbST y de IGF-I pudieran haber subsanado, por lo menos parcialmente, dichas fallas.

Se concluye que la aplicación de 500 mg de rbST al inicio del estro de vaquillas Holstein no afecta el desarrollo ni la función del folículo ovulatorio y del cuerpo lúteo subsecuente, debiendo investigarse con más detalle las razones de las diferencias con respecto a estudios realizados con animales en distintos estados fisiológicos.

Capítulo 4.

Efecto de la administración de rbST al inicio del estro sobre el desarrollo embrionario y las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein superovuladas al primer servicio.

Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto de la administración de somatotropina bovina producida por recombinación (rbST), al inicio del estro, sobre el desarrollo embrionario y las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein de primer servicio, se utilizaron 12 vacas superovuladas con FSH-LH (dosis total 1000 UI de FSH y 1000 UI de LH) las que, al inicio del estro fueron divididas en dos grupos: Grupo rbST (n=7) que recibieron 500 mg de rbST y Grupo testigo (n=5) que recibieron 1.4 ml de solución salina. La totalidad de las hembras fueron inseminadas artificialmente a las 18 y 30 horas, y la colección no quirúrgica se realizó 7 días después. Se comparó el número total de óvulos y embriones, el número y porcentaje de embriones transferibles, así como las concentraciones de progesterona sérica del día 0 (IA) al 7. El número total de óvulos y embriones fue de 6.14 ± 1.41 para el grupo rbST y de 4.6 ± 1.47 para el grupo testigo, el número de embriones transferibles correspondió a 2.29 ± 1.41 y 3.44 ± 1.47 y el porcentaje de embriones transferibles al 88.9% (16/18) y 100% (17/17), respectivamente, sin que se detectara diferencia en ninguno de los casos ($P > 0.05$). Las concentraciones de progesterona sérica tampoco difirieron ($P > 0.05$). Se concluye que un tratamiento con 500 mg de rbST aplicado al inicio del estro en vacas Holstein de primer servicio no afecta el número total de embriones y óvulos, el número y porcentaje de embriones transferibles ni las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein superovuladas a primer servicio.

Palabras clave: rbST, EMBRION, SUPEROVULACION

Introducción

La somatotropina bovina producida por recombinación genética (rbST) ha mostrado su acción galactopoiética en un amplio rango de condiciones experimentales (Bauman, 1992; Cunningham, 1994). Con la administración de rbST se incrementan drásticamente los niveles tanto en sangre como en diversos fluidos y tejidos corporales, del factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I) (Lefebvre y Block, 1992; Gong *et al.*, 1993^A; Lucy *et al.*, 1995), el cual representa el mediador de muchas de las acciones de la somatotropina (Hill, 1989; Giudice, 1992).

El IGF-I es el mediador de muchas de las acciones de la somatotropina, ya que es mitogénico *per se* (McCusker, 1998) y, además, potencializa a otros factores de crecimiento con mayor actividad mitogénica (Corps y Brown, 1988; Simmen *et al.*, 1993). Al interactuar con gonadotropinas estimula la diferenciación celular y la esteroidogénesis (Spicer *et al.*, 1993; Spicer y Echterkamp, 1995; De Moura *et al.*, 1997).

El líquido folicular contiene una gran concentración de IGF-I, especialmente el folículo preovulatorio (Spicer y Enright, 1991; Yuan *et al.*, 1998), el IGF-I participa en la maduración del ovocito y la ovulación (Hill, 1989), además de incrementar los receptores para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985).

El cuerpo lúteo de los bovinos presenta una gran cantidad de receptores para somatotropina (Lucy *et al.*, 1993; Yuan y Lucy, 1996) y algunos tratamientos con rbST han logrado aumentar las concentraciones de progesterona circulante (Schem *et al.*, 1990; Gallo y Block, 1991).

Se ha demostrado la presencia de IGF-I tanto en el líquido oviductal (Schmidt *et al.*, 1994; Makarevich y Sirotkin, 1997) como uterino (Lucy *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1998) así como la de receptores para IGF-I en el embrión bovino (Watson *et al.*, 1992). Además, algunos investigadores han establecido el efecto

benéfico de la adición de IGF-I, solo o junto con otros factores de crecimiento, sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro* (Matsui *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 1995; Gandolfi *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1997).

Por otra parte, en algunos estudios en donde se ha administrado rbST pocos días antes de un tratamiento superovulatorio de vacas y vaquillas fértiles ha sido encontrado un efecto positivo sobre el número de embriones obtenidos y/o la calidad de estos (Rieger *et al.*, 1990; Gong *et al.*, 1993^B; Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996). Sin embargo, al haberse aplicado la rbST antes del tratamiento superovulatorio es difícil determinar si los efectos se deben a un mayor número de ovulaciones, a un mejor desarrollo del ovocito o a efectos sobre el crecimiento y viabilidad de los embriones propiamente dichos.

En estudios previos de nuestro laboratorio la administración de 500 mg de rbST el día del estro y una segunda dosis 10 días después (Morales, 1993), o bien, solamente la primera dosis (Mendoza, 2000), ha probado aumentar el índice de concepción de vacas Holstein repetidoras. En dichos estudios fue postulado, entre otras teorías, que el citado tratamiento con rbST tiene un efecto benéfico, vía IGF-I en líquido oviductal y/o uterino, sobre la diferenciación celular y crecimiento de los embriones. Además, los resultados de otro estudio (Morales, 2000, capítulo previo) demuestra que la aplicación de rbST al inicio del estro no tiene efectos sobre el desarrollo folicular final, su producción de estradiol ni el momento de la ovulación, lo que sugiere que el efecto positivo sobre la fertilidad observada probablemente se deba a un efecto sobre el desarrollo del propio embrión.

El objetivo del presente trabajo fue el determinar el efecto de la rbST, aplicada al inicio del estro, sobre el desarrollo embrionario y las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein a primer servicio, animales en los cuales la infertilidad previa no constituye un factor involucrado en la respuesta.

Material y métodos

El presente estudio se realizó en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, en Hidalgo, México, cuya localización geográfica es 19° 50' de latitud Norte y 98° 58' de longitud Oeste, su altura es de 2109 msnm y predomina el clima Cb(wo)(e)g. La temperatura promedio anual es de 15.6°C y la precipitación pluvial media anual es de 611.2 mm (García, 1987).

Se utilizaron 12 vacas Holstein multíparas con un promedio de 3.75 ± 1.8 partos, 79.42 ± 22.11 días post-parto y una producción láctea de 36.07 ± 6.62 litros/día.

Al día 10 post-estro la totalidad de las vacas fueron revisadas ultrasonográficamente (Aloka SSO-500 con transductor de 7.5 MHz) para confirmar la presencia de un cuerpo lúteo mayor a 2 cm de diámetro y medir el folículo dominante. Ese mismo día se inició un tratamiento superovulatorio con 10 inyecciones intramusculares de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Pluset, Serono Italia) cada 12 horas, a dosis decrecientes por 5 días (dosis total 1000 UI de FSH y 1000 UI de LH) y aplicaciones de 25 mg de dinoprost (Lutalyse, Pharmacia y Upjohn México) junto con la séptima y octava inyecciones. Al inicio del estro los animales fueron aleatoriamente divididos en dos grupos:

Grupo rbST (n=7). Las vacas de este grupo recibieron 500 mg de rbST en un vehículo de liberación lenta (Lactotropina, Elanco México) por vía subcutánea en la fosa isquiorrectal derecha.

Grupo testigo (n=5). Las cuales recibieron 1.4 ml de solución salina fisiológica (Laboratorios PISA, México) por la misma vía.

Las vacas fueron inseminadas artificialmente a las 18 y 30 horas después del inicio del estro con semen descongelado proveniente de un solo semental de fertilidad probada y todas las inseminaciones fueron realizadas por el mismo

técnico.

Se colectaron muestras de sangre a partir de la vena o arteria coccígea diariamente, desde el día de la IA (día 0) hasta el día de la colección embrionaria (día 7). Las muestras fueron centrifugadas a 1500 g por 10 minutos y los sueros separados y congelados a -20°C hasta su análisis para la cuantificación de progesterona por medio de radioinmunoensayo en fase sólida (Pulido *et al.*, 1991). La sensibilidad del método fue de 0.15 ng/ml, con un coeficiente de variación intra e interensayo para la dosis baja de 3.4% y 9.81%, respectivamente, mientras que para la dosis alta correspondió a 5.64% y 7.37%.

La colección se realizó con el método no quirúrgico y las estructuras obtenidas fueron evaluadas de acuerdo al criterio universal (Robertson y Nelson, 1998).

Se comparó el número de óvulos más embriones y el número de embriones transferibles (mórulas y blastocistos de calidad uno y dos) de cada grupo por medio de un análisis de varianza (Gill, 1978), donde se contemplaron los efectos del tratamiento, días post-parto, producción láctea y la presencia o no de un folículo mayor a 10 mm al momento de iniciar la superovulación, así como de las interacciones entre el tratamiento y las demás variables. El porcentaje de embriones transferibles fue comparado con una prueba de Chi cuadrada (Gill, 1978). Adicionalmente, el porcentaje de embriones transferibles fue comparado con una prueba de t de Student (Gill, 1978), para la cual fue realizada una transformación arco seno de la raíz cuadrada de la variable.

A su vez, se comparó la concentración de progesterona sérica del día 0 al 7 con un análisis de varianza para mediciones repetidas, utilizando para ello el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (Littell *et al.*, 1998).

Resultados

La cantidad total de óvulos más embriones fue de 6.14 ± 1.4 para el grupo rbST y 4.6 ± 1.47 para el testigo (Cuadro 1). Los embriones transferibles promediaron 2.29 ± 1.41 y 3.4 ± 1.47 , respectivamente (Cuadro 1), sin que se encontrara efecto de ninguna de las variables e interacciones contempladas en ambos casos ($P > 0.05$). El porcentaje de embriones transferibles resultó similar entre grupos en los dos análisis utilizados, al ser de 88.9% (16/18) en el grupo tratado y 100% (17/17) en el testigo ($P > 0.05$). En el grupo tratado con rbST se obtuvieron 15 embriones calidad uno, un embrión calidad dos y dos calidad tres. En el grupo testigo se encontraron 15 embriones calidad uno y dos calidad dos.

En cuanto a las concentraciones de progesterona sérica se encontró un esperado efecto del día ($P < 0.01$) pero no así del tratamiento ni de la interacción tratamiento*día ($P > 0.05$). Los valores diarios se muestran en el Cuadro 2.

CUADRO 4.1.
RESPUESTA SUPEROVULATORIA DE VACAS HOLSTEIN TRATADAS CON
500 mg DE rbST AL INICIO DEL ESTRO Y VACAS TESTIGO (MEDIA±ERROR
ESTÁNDAR)

Grupos	N	Número de óvulos + embriones	Número de embriones transferibles	Porcentaje de embriones transferibles
rbST	7	6.14±1.41	2.29±1.41	88.9 (16/18)
Testigo	5	4.60±1.47	3.40±1.47	100 (17/17)

No se observó diferencia estadística en ninguna de las variables entre grupos ($P>0.05$).

CUADRO 4.2.
NIVELES DE PROGESTERONA SERICA (ng/ml) DE VACAS HOLSTEIN
SUPEROVULADAS TRATADAS CON 500 mg DE rbST AL INICIO DEL ESTRO
Y VACAS TESTIGO (MEDIA±ERROR ESTANDAR).

DIAS POST-IA	GRUPO	
	rbST	Testigo
0	0.36 ± 4.2	0.25 ± 4.9
1	0.4 ± 4.2	0.2 ± 4.9
2	1.64 ± 4.2	0.9 ± 4.9
3	6.28 ± 4.2	5.04 ± 4.9
4	11.92 ± 4.2	15.79 ± 4.9
5	19.2 ± 4.2	18.82 ± 4.9
6	24.59 ± 4.2	25.96 ± 4.9
7	33.64 ± 4.2	34.38 ± 4.9

No se observó diferencia estadística entre grupos ($P>0.05$).

Discusión

A pesar de su potencial importancia, existen pocos reportes acerca del uso de la rbST junto con tratamientos superovulatorios. En dichos trabajos la rbST se aplicó antes de la administración de las gonadotropinas (Herrler *et al.*, 1990; Gong *et al.*, 1993^B; Gray *et al.*, 1993; Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996), simultáneamente con ellas (Rieger *et al.*, 1990; Rieger *et al.*, 1991) o bien, al momento de la inseminación (Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994).

En términos generales, en los trabajos anteriores es evidente un efecto positivo sobre el número de embriones obtenidos y, en algunos casos, sobre la calidad de dichos embriones al aplicar la rbST con anticipación al tratamiento con FSH o eCG. Se sabe que un pretratamiento con rbST aumenta la cantidad de folículos antrales pequeños presentes en los ovarios al iniciar la aplicación de gonadotropinas (Gong *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1996) y que la respuesta superovulatoria está correlacionada positivamente con el número de folículos de ese tipo al tiempo de iniciar el régimen superovulatorio (Romero *et al.*, 1991). A su vez, se ha demostrado que un tratamiento con rbST aplicado en vacas y vaquillas *in vivo* estimula la maduración de sus ovocitos *in vitro* (Pavlok *et al.*, 1996) y que el IGF-I favorece el desarrollo embrionario en trabajos *in vitro* (Palma *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 1995; Gandolfi *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1997).

En el presente estudio la rbST fue aplicada al detectarse las vacas en estro, por lo que más que esperarse un efecto en el número de estructuras obtenidas se pensó que podría mejorar el desarrollo de los embriones.

La hipótesis anterior se sustentó en dos hechos principalmente, primero en los resultados de los trabajos de Morales (1993) y Mendoza (2000), los cuales aplicaron el tratamiento de rbST también en el día 0 y lograron aumentar el índice de concepción de vacas repetidoras y segundo, en el hecho de que la mortalidad embrionaria temprana, caracterizada por una deficiente diferenciación celular y

retraso en el desarrollo constituye el principal problema que incide sobre los bajos índices de concepción obtenidos en los bovinos, tanto de animales fértiles como infértiles. (Zavy, 1994).

El porcentaje de embriones transferibles obtenido en el presente trabajo, utilizando vacas normales, fue similar entre grupos, sin embargo, de las 12 vacas utilizadas solo en una fueron obtenidos dos embriones no transferibles, las restantes produjeron exclusivamente embriones de buena calidad. Este hecho podría explicar la carencia de efecto del tratamiento, ya que aún cuando la aplicación de rbST fuera capaz de ayudar en la diferenciación y/o crecimiento de los embriones con problemas de ese tipo, los embriones normales, como lo fueron casi la totalidad en este estudio, no son susceptibles de ser mejorados. Lo anterior sería apoyado por lo reportado por Lucy *et al.* (1995), quienes recuperaron embriones provenientes de vacas con alta fertilidad tratadas diariamente con 25 mg de rbST a partir del inicio del estro (como en el presente estudio) y vacas testigo, no encontrando diferencias en el tamaño del embrión al día 17. Lo anterior sugeriría que el efecto positivo del tratamiento, si realmente existiese, no podría sobrepasar el límite establecido por la normalidad de los embriones, lo cual probablemente sería regulado por las proteínas de enlace del IGF-I (IGFBP's), ya que se sabe que tanto la rbST (Cohick *et al.*, 1992) como el IGF-I (Prelle *et al.*, 1999) son capaces de incrementar la síntesis de algunas de dichas proteínas, lo cual funciona como un mecanismo de autoregulación de su bioactividad.

Por lo anterior, existe la posibilidad de que la respuesta a un tratamiento de este tipo, aplicado al inicio del estro, dependa de la proporción de embriones que sufren retardo del desarrollo, degeneración y posterior muerte en un grupo de animales en particular. En el presente estudio dicha tendencia no fue manifiesta y por lo tanto no hubo efecto del tratamiento, sin embargo, si el tratamiento fuera aplicado en un grupo en donde se presentara una mayor incidencia de anormalidades embrionarias quizás podría evidenciarse alguna mejoría en el desarrollo de los mismos.

En cuanto a los niveles de progesterona, el presente estudio no mostró efecto del tratamiento, lo cual coincide con lo reportado por Rieger *et al.* (1990) y por Kuehner *et al.* (1993) quienes tampoco lo encontraron y difiere del trabajo de Rieger *et al.* (1991) en el cual se encontró un efecto positivo, sin embargo, los niveles de progesterona de los animales superovulados están relacionados con el número de cuerpos lúteos desarrollados, ya sea a partir de ovulaciones o bien de folículos luteinizados, por lo que no es posible separar esta variable de un eventual estímulo de la esteroidogénesis.

Se concluye que un tratamiento con 500 mg de rbST aplicado al inicio del estro no afecta el número de embriones y óvulos, el número y porcentaje de embriones transferibles ni las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein superovuladas al primer servicio.

Capítulo 5.

Efecto de la administración de rbST al inicio del estro sobre el desarrollo embrionario y las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein repetidoras superovuladas.

Resumen

Con el objetivo de determinar el efecto de la rbST sobre el desarrollo embrionario y progesterona sérica de vacas Holstein repetidoras se utilizaron 16 vacas con ≥ 4 servicios infructuosos previos. Los animales se sometieron a un tratamiento superovulatorio con FSH-LH (1000 UI c/u) y al inicio del estro fueron divididas en dos grupos: Grupo rbST (n=8) a las que se les aplicaron 500 mg de rbST y el Grupo testigo (n=8) que fue inyectado con solución salina. La totalidad de las vacas fueron inseminadas 18 y 30 horas después y la colección no quirúrgica se realizó al día 7 (IA día 0). Se comparó el número total de embriones más óvulos, el número y porcentaje de embriones transferibles y las concentraciones de progesterona sérica del día 0 al 7. El total de embriones y óvulos fue de 5.5 ± 1.49 en el grupo rbST y 5.13 ± 1.96 en el testigo. El número de embriones transferibles correspondió a 3.38 ± 1.08 y 1.75 ± 1.37 , respectivamente, sin encontrar diferencia en ninguno de los casos ($P > 0.05$). En el porcentaje de embriones transferibles, en cambio, sí fue hallada diferencia ($P < 0.05$) al ser de 84.38% (27/32) y 54.55% (12/22), respectivamente. Las concentraciones de progesterona sérica no difirieron entre grupos ($P > 0.05$). Se concluye que un tratamiento con 500 mg de rbST aplicado al inicio del estro aumenta el porcentaje de embriones transferibles pero no afecta el número total de embriones y óvulos, el número de embriones transferibles ni las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein repetidoras superovuladas.

Palabras clave: rbST, SUPEROVULACIÓN, VACA REPETIDORA

Introducción

La vaca repetidora es aquella con por lo menos tres servicios infructuosos previos y sin anormalidades detectables a la palpación rectal (Tanabe y Casida, 1949). El parámetro aceptado es de menos del 10% del hato (Gaines, 1989) aunque con frecuencia el 25% de las hembras caen en esta categoría (Bartlett, 1986; Torres y Valencia, 1995).

Se ha demostrado que los embriones provenientes de este tipo de vacas presentan una mayor incidencia de anormalidades que las vacas fértiles (Linares, 1982; Gustafsson, 1985; Zavy, 1994). Dichas anormalidades se refieren básicamente a una deficiente diferenciación y un retardo en su desarrollo, provocadas en muchos de los casos por un ambiente oviductal y/o uterino inadecuado (Wiebold, 1988; Albiñ *et al.*, 1989).

Por otra parte, la somatotropina bovina producida por recombinación genética (rbST) ha mostrado su acción galactopoiética en un amplio rango de condiciones experimentales (Bauman, 1992; Cunningham, 1994). Con la administración de rbST se incrementan los niveles, en sangre y en diversos fluidos y tejidos corporales, del factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I) (Lefebvre y Block, 1992; Gong *et al.*, 1993^A; Lucy *et al.*, 1995), el cual representa el mediador de muchas de las acciones de la somatotropina (Hill, 1989; Giudice, 1992).

El IGF-I es mitogénico *per se* (McCusker, 1998) y, además, potencializa a otros factores de crecimiento con mayor actividad mitogénica (Corps y Brown, 1988; Simmen *et al.*, 1993). Al interactuar con gonadotropinas estimula la diferenciación celular y la esteroidogénesis en las células foliculares (Spicer *et al.*, 1993; Spicer y Echtenkamp, 1995; De Moura *et al.*, 1997).

El líquido del folículo preovulatorio contiene una gran concentración de IGF-I (Spicer y Enright, 1991; Yuan *et al.*, 1998). El IGF-I participa en la maduración del óvulo y en la ovulación (Hill, 1989), además de incrementar los receptores para la

hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985).

El cuerpo lúteo de los bovinos presenta una gran cantidad de receptores para somatotropina (Lucy *et al.*, 1993; Yuan y Lucy, 1996) y con algunos tratamientos con rbST se ha logrado aumentar las concentraciones de progesterona circulante (Schem *et al.*, 1990; Gallo y Block, 1991).

Se ha demostrado la presencia de IGF-I tanto en el líquido oviductal (Schmidt *et al.*, 1994; Makarevich y Sirotkin, 1997) como uterino (Lucy *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1998), así como de receptores para IGF-I (Watson *et al.*, 1992) en el embrión bovino. A su vez, algunos investigadores han establecido el efecto benéfico de la adición de IGF-I, solo o junto otros factores de crecimiento, sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro* (Matsui *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 1995; Gandolfi *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1997; Rieger *et al.*, 1998).

Por otra parte, se han realizado diversos estudios en los que se ha administrado rbST pocos días antes de un tratamiento superovulatorio y, en general, se ha encontrado un efecto positivo sobre el número de embriones obtenidos y/o la calidad de estos (Rieger *et al.*, 1990; Gong *et al.*, 1993^B; Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996).

Por otra parte, se han realizado algunos estudios en nuestro laboratorio (Morales, 1993; Rodríguez, 1999; Mendoza, 2000) donde se ha evaluado el efecto de la administración de rbST sobre la fertilidad y las concentraciones de progesterona de vacas Holstein.

Morales (1993) aplicó 500 mg de rbST el día del estro y una segunda dosis 10 días después y mejoró en 10.57% el índice de concepción de vacas Holstein repetidoras, obteniendo 36.59% en las vacas tratadas y 26.02% en las testigo ($p < 0.05$). A su vez, se provocó un aumento marginal en los niveles de progesterona sérica.

Por su parte, Rodríguez (1999) igualmente administró dos dosis de 500 mg de rbST pero esta vez fue con 14 días de diferencia, además de que las aplicó al día 3 y al 17 post-Inseminación Artificial (IA) tanto de vacas de primer servicio

como repetidoras (≥ 4 servicios). Sin embargo, no se encontró efecto en la fertilidad obtenida por las vacas de primer servicio (42.1% y 40.2%), por las repetidoras (40.4% y 40.9%) ni en los niveles de progesterona de ambos tipos de animales.

Por último, Mendoza (2000) volvió a aplicar la rbST el día del estro tanto de vacas de primer servicio como de vacas repetidoras pero con la diferencia de que no repitió la dosis, encontrando diferencia estadística en las vacas repetidoras (46.2% y 34.9%) pero no en las vacas de primer servicio (39.7% y 34.8%) ni en los niveles de progesterona.

En dichos estudios se propuso, entre otras teorías, que el tratamiento tiene un efecto benéfico sobre la diferenciación celular y crecimiento de los embriones, quizás mediado a través de un incremento en los niveles oviductales y/o uterinos de IGF-I.

En un experimento posterior (capítulo 4) la aplicación de rbST el día del estro a vacas superovuladas al primer servicio no tuvo efecto sobre la calidad embrionaria al día 7, por lo que existe la posibilidad de que la rbST aplicada de esta manera solo favorezca el desarrollo embrionario de hembras infértiles, donde la incidencia de anomalías es mayor (Linares, 1982; Gustafsson, 1985). A su vez, Lucy *et al.* (1995), recuperaron embriones provenientes de vacas tratadas diariamente con 25 mg de rbST por 16 días, a partir del inicio del estro y de vacas testigo, no encontrando diferencias ni en el tamaño del embrión ni en las concentraciones de IGF-I en líquido uterino (45.4 ng/ml contra 30.5 ng/ml) al día 17, sin embargo, en dicho estudio fueron utilizadas vacas que resultaron con una alta fertilidad (68.75%) y, además, la comparación fue hecha al día 17 post-inseminación, cuando una gran parte de los embriones degenerados ya pudieron haber sufrido una desintegración y no ser identificados (Gustafsson, 1985).

El objetivo del presente trabajo fue el determinar el efecto de la rbST aplicado al inicio del estro sobre la calidad embrionaria y la progesterona sérica de vacas Holstein repetidoras superovuladas.

Material y métodos

El presente estudio se realizó en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, en Hidalgo, México, y cuya localización geográfica es 19° 50' de latitud Norte y 98° 58' de longitud Oeste, su altura es de 2109 msnm y predomina el clima Cb(wo)(e)g. La temperatura promedio anual es de 15.6°C y la precipitación pluvial media anual es de 611.2 mm (García, 1987).

Se utilizaron 16 vacas Holstein repetidoras multíparas promediando 4.25 ± 1.73 partos, 337.5 ± 121.34 días post-parto y 7.38 ± 3.14 servicios.

Al día 10 post-estro la totalidad de las vacas fueron revisadas ultrasonográficamente (Aloka SSO-500 con transductor de 7.5 MHz) para confirmar la presencia de un cuerpo lúteo mayor a 2 cm de diámetro y medir el folículo dominante. Ese mismo día se inició un tratamiento superovulatorio consistente en 10 inyecciones intramusculares de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Pluset, Serono Italia) las que fueron aplicadas cada 12 horas a dosis decrecientes por 5 días (dosis total 1000 UI de FSH y 1000 UI de LH). Además recibieron aplicaciones de 25 mg de dinoprost (Lutalyse, Pharmacia y Upjohn, México) junto con la séptima y octava inyecciones. Al inicio del estro los animales fueron aleatoriamente divididos en dos grupos:

Grupo rbST (n=8). Estas vacas recibieron 500 mg de rbST en un vehículo de liberación lenta (Lactotropina, Elanco, México) vía subcutánea en la fosa isquiorectal derecha.

Grupo testigo (n=8). Cuyas hembras recibieron 1.4 ml de solución salina fisiológica (Laboratorios PISA, México) por la misma vía.

Las vacas fueron inseminadas artificialmente a las 18 y 30 horas después del inicio del estro con semen descongelado proveniente de un solo semental y por un solo técnico.

Se colectaron diariamente muestras de sangre mediante punción de la vena o arteria coccígea comenzando desde el día de la IA (día 0) hasta el día de la

colección embrionaria (día 7). Las muestras fueron centrifugadas a 1500 g por 10 minutos y el suero separado y congelado a -20°C hasta su análisis para la cuantificación de progesterona por medio de radioinmunoensayo en fase sólida (Pulido *et al.*, 1991). La sensibilidad del método fue de 0.15 ng/ml, con un coeficiente de variación intra e interensayo para la dosis baja de 3.4% y 9.81%, respectivamente, mientras que para la dosis alta correspondió a 5.64% y 7.37%.

La colección se realizó con el método no quirúrgico y las estructuras obtenidas evaluadas según criterio universal (Robertson y Nelson, 1998).

Se comparó el número total de óvulos más embriones y el número de embriones transferibles (mórulas y blastocistos calidad uno y dos) de cada grupo por medio de un modelo lineal general (Gill, 1978) donde se contemplaron los efectos del tratamiento, días post-parto, producción láctea y la presencia o no de un folículo mayor a 10 mm al momento de iniciar la superovulación, así como de las interacciones entre el tratamiento y las demás variables. El porcentaje de embriones transferibles fue comparado con una prueba de Chi cuadrada (Gill, 1978). Adicionalmente, el porcentaje de embriones transferibles fue comparado con una prueba de t de Student (Gill, 1978), para la cual fue realizada una transformación arco seno de la raíz cuadrada de la variable.

A su vez, se comparó la concentración de progesterona sérica del día 0 al 7 con un análisis de varianza para mediciones repetidas, utilizando para ello el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (Littell *et al.*, 1998).

Resultados

La cantidad total de óvulos más embriones fue de 5.5 ± 1.49 para el grupo rbST y 5.13 ± 1.96 para el testigo (Cuadro 1). Los embriones transferibles promediaron 3.38 ± 1.08 y 1.75 ± 1.37 , respectivamente (Cuadro 1), sin que se encontrara efecto de ninguna de las variables e interacciones contempladas en ambos casos ($P > 0.05$).

El porcentaje de embriones transferibles, en cambio, mostró diferencia entre grupos ($P < 0.05$) en ambos análisis, al ser de 84.38% (27/32) en el grupo tratado y 54.55% (12/22) en el grupo testigo (Cuadro 1).

La etapa de desarrollo y calidad de los embriones obtenidos son mostradas en el cuadro 2.

En cuanto a las concentraciones de progesterona sérica existió un esperado efecto del día ($P < 0.01$) pero no del tratamiento ni de la interacción tratamiento*día ($P > 0.05$). Los valores diarios son mostrados en el Cuadro 3.

CUADRO 5.1.
RESPUESTA SUPEROVULATORIA DE VACAS HOLSTEIN REPETIDORAS
TRATADAS CON 500 mg DE rbST AL INICIO DEL ESTRO Y VACAS TESTIGO
(MEDIA±ERROR ESTANDAR)

Grupos	n	Número de óvulos + embriones	Número de embriones transferibles	Porcentaje de embriones transferibles
RbST	8	5.5 ± 1.49 a	3.38 ± 1.08 a	84.38 a
Testigo	8	5.13 ± 1.96 a	1.75 ± 1.37 a	54.55 b

^{a,b} Para una misma variable (columna) diferente literal indica diferencia estadística (P<0.05).

**CUADRO 5.2.
ETAPA DE DESARROLLO Y CALIDAD DE EMBRIONES OBTENIDOS DE
VACAS HOLSTEIN REPETIDORAS TRATADAS CON 500 mg DE rbST AL
INICIO DEL ESTRO Y VACAS TESTIGO.**

	G R U P O	
	rbST	TESTIGO
2 CELULAS	1	4
4 CELULAS	1	0
MORULAS		
CALIDAD 1	2	0
CALIDAD 2	9	2
CALIDAD 3	3	6
BLASTOCISTOS		
CALIDAD 1	10	9
CALIDAD 2	6	1

CUADRO 5.3.
NIVELES DE PROGESTERONA SERICA (ng/ml) DE VACAS HOLSTEIN
REPETIDORAS SUPEROVULADAS TRATADAS CON 500 mg DE rbST AL
INICIO DEL ESTRO Y VACAS TESTIGO (MEDIA±ERROR ESTANDAR).

DIAS POST-IA	G R U P O	
	rbST	Testigo
0	0.05 ± 2.660.	0.06 ± 2.66
1	0.08 ± 2.66	0.05 ± 2.66
2	0.9 ± 2.66	0.84 ± 2.66
3	5.82 ± 2.66	5.14 ± 2.66
4	12.32 ± 2.66	8.33 ± 2.66
5	16.4 ± 2.66	16.11 ± 2.66
6	23.28 ± 2.66	21.98 ± 2.66
7	18.23 ± 2.66	13.96 ± 2.66

No se observó diferencia estadística entre grupos ($P>0.05$).

Discusión

Se encontró diferencia a favor del grupo rbST en lo que respecta a la calidad embrionaria. Existen relativamente pocas publicaciones de trabajos en donde se utilice la rbST junto con tratamientos superovulatorios y en todos ellos fueron utilizadas vacas o vaquillas normales en cuanto a fertilidad.

En dichos trabajos la rbST fue aplicada antes de la administración de gonadotropinas (Herrler *et al.*, 1990; Gong *et al.*, 1993^B; Gray *et al.*, 1993; Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996), al momento de ésta (Rieger *et al.*, 1990; Rieger *et al.*, 1991) o bien, al momento de la inseminación (Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994).

En términos generales, en dichos trabajos se ha encontrado un efecto positivo sobre el número de embriones obtenidos y, en algunos casos, sobre la calidad de dichos embriones al aplicar la rbST con anticipación al tratamiento con gonadotropinas en hembras normales.

Como se mencionó, tanto el estudio de Kuehner *et al.* (1993) como el de Herrler *et al.* (1994) se incluyeron en los diseños experimentales grupos en donde la rbST se aplicó al momento de la inseminación artificial, sin embargo, en ninguno de los casos se encontró efecto del tratamiento. Los primeros reportan un número similar de embriones totales (11.1 ± 2.2 contra 10 ± 1.5), de embriones transferibles (7 ± 1.7 contra 5.9 ± 1.4) y porcentaje de embriones transferibles (62.9% contra 58.6%), mientras que los segundos coinciden en lo que respecta al total de óvulos y embriones (4.4 ± 1.4 contra 5.2 ± 1.2) y al número de embriones transferibles (2.5 ± 1.1 contra $3.1 \pm .9$).

Al igual que en estos dos últimos trabajos, en el presente estudio no se esperaba obtener un mayor número de estructuras debido a que el tratamiento se aplicó al inicio del estro y no con más anticipación como para favorecer el desarrollo de un mayor número de folículos pequeños antes de iniciar la aplicación de gonadotropinas (Gong *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1996), número que se

encuentra correlacionado positivamente con la respuesta superovulatoria (Romero *et al.*, 1991).

En cuanto al porcentaje de embriones transferibles, el presente estudio mostró un claro efecto del tratamiento, al corresponder a 84.38% contra solo 54.55% del grupo testigo. Lo anterior coincide con algunos de los trabajos mencionados (Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996).

A diferencia de los otros reportes, en el presente fueron utilizadas vacas repetidoras. Es conocido que los embriones provenientes de ese tipo de animales presentan una mayor incidencia de anomalías y retraso del desarrollo. Como se mencionó anteriormente, Linares (1982) recuperó embriones de 7 días de vaquillas vírgenes y repetidoras, encontrando más embriones normales en las vaquillas vírgenes que en las repetidoras (74% contra 27.5%), el resto correspondió a embriones con anomalías de desarrollo (13% contra 35%) y degenerados (13% contra 37.5%). A su vez, Gustafsson (1985) recuperó embriones de 7 días de ciclos consecutivos de vaquillas vírgenes y repetidoras, reportando porcentajes de embriones normales de 56% contra 30% y porcentaje de embriones morfológicamente desviados de 11 % contra 38% en dos ciclos consecutivos. Más embriones alcanzaron la etapa de blastocisto en las vaquillas vírgenes que en las repetidoras (47% contra 24%).

Morales (1993) y Mendoza (2000) aplicaron un tratamiento similar al presente el día de la inseminación de vacas repetidoras y obtuvieron aumentos en la fertilidad del 10.57% y 11.3%, respectivamente. Ambos trabajos, en conjunto con el presente, demostrarían el efecto positivo del tratamiento con rbST sobre el desarrollo de los embriones provenientes de vacas repetidoras y, en consecuencia, sobre la fertilidad.

Se sabe que el embrión bovino posee receptores para IGF-I (Watson *et al.*, 1992), que la adición de este factor de crecimiento mejora el desarrollo de embriones *in vitro* (Palma *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 1995; Gandolfi *et al.*, 1996;

Matsui *et al.*, 1997; Rieger *et al.*, 1998) y que las células oviductales son capaces de secretar IGF-I al añadirles somatotropina *in vitro* (Makarevich y Sirotkin, 1997). Lo anterior sugeriría que el efecto positivo es mediado por un aumento en la concentración de IGF-I oviductal y quizás uterino. Sin embargo, Lucy *et al.* (1995) aplicaron rbST el día del estro y cuantificaron IGF-I en fluido uterino 17 días después, no encontrando diferencia con el grupo testigo, no obstante, en dicho trabajo se utilizaron vacas que resultaron con una alta fertilidad lo que llevaría a especular que quizás el tratamiento sea capaz de subsanar un bajo nivel oviductal y/o uterino de IGF-I de animales infértiles pero no de aumentar los niveles normales de animales fértiles.

Dicha hipótesis se apoyaría en los resultados del segundo experimento (capítulo 4) el cual fue idéntico al presente pero con la utilización de vacas de primer servicio y en el que el porcentaje de embriones transferibles fue similar entre grupos.

En cuanto a los niveles de progesterona, el presente estudio no mostró efecto del tratamiento, lo cual coincide con lo reportado por Rieger *et al.* (1990) y por Kuehner *et al.* (1993) quienes tampoco lo encontraron y difiere del trabajo de Rieger *et al.* (1991) en el cual se encontró un efecto positivo, sin embargo, los niveles de progesterona de los animales superovulados están relacionados con el número de cuerpos lúteos desarrollados, ya sea a partir de ovulaciones o bien de folículos luteinizados, por lo que no es posible separar esta variable de un eventual estímulo de la esteroidogénesis.

Se concluye que un tratamiento con 500 mg de rbST aplicado al inicio del estro aumenta el porcentaje de embriones transferibles pero no afecta el número total de embriones y óvulos, el número de embriones transferibles ni las concentraciones de progesterona sérica de vacas Holstein repetidoras superovuladas.

Capítulo 6.

Discusión general

Como ya fue mencionado, en trabajos previos (Morales, 1993; Mendoza, 2000) se logró aumentar en 10.57% y 11.3% el índice de concepción de vacas Holstein repetidoras (≥ 4 servicios) al administrar 500 mg de rbST el día del estro.

Los tres experimentos detallados en el presente trabajo constituyeron una continuación de los anteriores para avanzar en la comprensión del mecanismo de acción que condujo a dicho aumento en la fertilidad y evaluar así el uso potencial del tratamiento corto de rbST aplicado el día del estro, por lo tanto, la discusión se centra en la relación que guardan los nuevos estudios realizados con respecto a los previos.

En el primer experimento se determinó que el tratamiento no afecta el momento de la ovulación, el cual ha sido señalado como causante de infertilidad (Bostedt, 1976; Erb *et al.*, 1976), por lo que un efecto del tratamiento sobre dicha variable hubiera podido explicar por lo menos parte de su efecto benéfico. Como se discute más adelante, el tipo de animal utilizado pudo haber influido en la falta de respuesta, al presentar las vaquillas menos anomalías de ese tipo en comparación con animales adultos en producción (Hernández-Cerón *et al.*, 1993). A su vez, no se observó un efecto en las características del folículo ovulatorio como son su diámetro y las concentraciones plasmáticas de estradiol. Posiblemente el tratamiento al momento del inicio del estro esté demasiado cerca de la ovulación, por lo que no llega a afectar el desarrollo final del folículo, su diámetro máximo ni el momento de la ovulación. Esto es especialmente probable si se piensa que el efecto tendría que ser mediado por IGF-I, ya que el folículo tiene escasos receptores para ST (Lucy *et al.*, 1993). Es necesario recordar que los niveles elevados de IGF-I se alcanzan hasta las 48 horas después de aplicar la rbST (Gong *et al.*, 1993^A). Sin embargo, también existe la posibilidad de que el momento de la ovulación no sea un acontecimiento que pueda variar

dramáticamente en vaquillas, ya que Hernández-Cerón *et al.* (1993) demostraron que en este tipo de animales el intervalo entre el estro y la ovulación es extremadamente constante, y que no se ve afectado en vaquillas repetidoras, a diferencia de lo que ocurre en vacas adultas en producción (Bostedt, 1976; Erb *et al.*, 1976).

En el segundo experimento, utilizando como modelo a vacas multíparas superovuladas de aproximadamente 80 días post-parto no se encontró un efecto del tratamiento sobre la cantidad y calidad de los embriones obtenidos.

Algunos investigadores han encontrado un efecto benéfico de la rbST sobre la cantidad de los embriones recolectados cuando es aplicada días antes del estro (Rieger *et al.*, 1990; Gong *et al.*, 1993^B; Herrler *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996) ya que en estos casos lo que se obtiene principalmente es un mayor número de ovulaciones, lo que se refleja en mayor número de embriones, sin embargo, este efecto benéfico sobre el desarrollo folicular no llega a presentarse cuando la hormona se administra al inicio del estro (el presente estudio) o bien al momento de la inseminación de hembras normales (Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994). A este respecto, varios estudios (Gong *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1996; Bols *et al.*, 1998; Buratini *et al.*, 1999) se ha informado que un tratamiento con rbST tiene un efecto estimulador sobre el número de folículos pequeños y medianos en los animales tratados y que el número de estos al inicio de un programa superovulatorio es fundamental en la respuesta alcanzada (Romero *et al.*, 1991). A su vez, estudios *in vitro* han mostrado el efecto positivo del IGF-I sobre la maduración de los ovocitos bovinos (Lorenzo *et al.*, 1994; Sakaguchi *et al.*, 1997; Rieger *et al.*, 1998; Sirotkin *et al.*, 1998).

En cuanto a la calidad de los embriones recuperados en algunos estudios se ha encontrado un efecto estimulante cuando la rbST es aplicada con anterioridad (Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996) pero no al momento de la inseminación (Kuehner *et al.*, 1993; Herrler *et al.*, 1994). En estos casos, la mejoría en la calidad embrionaria puede deberse, como en el

caso anterior, a un efecto sobre la maduración del ovocito, ya que se ha reportado una relación directa entre los procesos de maduración del ovocito y la calidad del embrión en que éste se convierte (Thatcher *et al.*, 1994; Bigelow *et al.*, 1997). Por su parte, el tratamiento puede favorecer la calidad de los embriones al modificar el ambiente oviductal-uterino, lo cual se discute posteriormente. El tiempo previo a la inseminación podría ser necesario para que los niveles de IGF-I se incrementen y fuese éste quien actúe a nivel oviductal-uterino, recordándose que los niveles elevados de IGF-I sérico se alcanzan aproximadamente a las 48 horas posteriores a la aplicación de rbST en vehículo de liberación lenta (Gong *et al.*, 1993^A).

En el tercer experimento (capítulo 5) se regresó al modelo animal original, es decir, el tratamiento se aplicó a vacas repetidoras superovuladas, lo cual no ha sido reportado antes, y los resultados fueron por demás interesantes. Mientras que en la cantidad de embriones recuperados no se alcanzó diferencia estadística, en la calidad de los embriones sí la hubo (84.38% contra 54.55% de embriones transferibles), lo que tiene algunas implicaciones.

Primeramente resalta el hecho de que utilizando vacas infértiles se haya podido mejorar la calidad embrionaria, lo que no ocurrió en el caso de vacas normales de primer servicio (capítulo 4). Lo anterior pone de manifiesto una diferente respuesta de acuerdo al tipo de animal utilizado.

Como ya se mencionó, el embrión bovino posee receptores para IGF-I (Schultz *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 1992), y que la adición de este factor de crecimiento mejora el desarrollo embrionario *in vitro* (Matsui *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 1995; Gandolfi *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1997), fundamentalmente hasta la etapa de mórula (Matsui *et al.*, 1995). También se sabe que las células oviductales son capaces de secretar IGF-I con la adición de somatotropina *in vitro* (Makarevich y Sirotkin, 1997). En base a lo anterior es factible especular que el efecto benéfico observado es debido a la acción del IGF-I a nivel oviductal y quizás uterino, lo que podría corregir, en cierta medida, las deficiencias en el desarrollo embrionario que se han reportado en hembras infértiles (Linares, 1982; Gustafsson, 1985; Peterson

et al., 1999), en cambio, en las vacas normales posiblemente las deficiencias de factores de crecimiento no es lo común, por lo que la administración de rbST no tendría ningún efecto sobre la calidad de los embriones. A la fecha no hay reportes de mediciones de IGF-I y sus proteínas de enlace a nivel oviductal y uterino de vacas infértiles con o sin tratamiento con rbST. En tres estudios recientes se determinó la presencia de IGF-I en el aparato reproductor de bovinos. Keller *et al.* (1998) compararon los niveles de IGF-I de líquido uterino de vacas normales sin tratamiento los días 13 al 15 post-estro y no encontraron efecto del día ni de la gestación. Por su parte, tanto Lucy *et al.* (1995) como Kirby *et al.* (1996) trataron vacas con rbST desde el día del estro. Los primeros no encontraron diferencias en IGF-I uterino ni en la longitud del embrión al día 17 post-estro y los segundos, a pesar de no detectar un efecto del tratamiento sobre la expresión de mRNA para IGF-I en oviducto y útero, encontraron que las vacas gestantes tuvieron una mayor cantidad de dicho mRNA, sin embargo, en dichos estudios las vacas utilizadas resultaron con una alta fertilidad.

Dichos trabajos, en su conjunto, llevarían a proponer la hipótesis de que el tratamiento con rbST aplicado al inicio del estro de animales infértiles podría subsanar un nivel deprimido de IGF-I oviductal y quizás uterino de algunos animales, el cual explicaría en mayor grado su infertilidad, pero no aumentar los niveles normales en animales fértiles, ni de provocar un crecimiento mayor al normal en los embriones. Por lo mismo, en los animales fértiles en los que se han visto resultados favorables al administrar la rbST días antes de la inseminación, el tratamiento influiría, fundamentalmente, en la maduración de los ovocitos.

Una variante a dicha teoría sería que el nivel deprimido de IGF-I oviductal/uterino de las hembras infértiles no fuera un problema de síntesis materna sino que se debiera a que, por problemas heredados o adquiridos, determinados genes del embrión temprano, responsables de provocar el aumento de dichos niveles, no fueran expresados adecuadamente.

Un candidato para esta función lo podría constituir, como en el caso del

cerdo, el estradiol. Se sabe que dicha sustancia es producida en grandes cantidades por los embriones porcinos como parte del mecanismo de reconocimiento de gestación, lo cual provoca un gran aumento en los niveles de IGF-I en el líquido uterino, lo que coincide con el crecimiento logarítmico de los embriones observado en dicha especie (Simmen *et al.*, 1992; Tavakkol *et al.*, 1988).

Por su parte, es conocido que el embrión bovino produce cierta cantidad de dicho esteroide sin que se sepa cual es su función exacta (Bazer *et al.*, 1986) y que la administración del mismo induce una drástica elevación del IGF-I (Murphy y Friesen, 1988; Norstedt *et al.*, 1989; Simpson *et al.*, 1997), una disminución de dos de sus inhibitorias proteínas de enlace (Yallampalli *et al.*, 1993), así como un aumento en la cantidad de un tipo de receptor para IGF-I en ratas (Chen y Roy, 1996).

Al no ser el estradiol parte del mecanismo de reconocimiento de gestación en los embriones bovinos, se propone que éste podría actuar como un modulador de su propio desarrollo a nivel oviductal y uterino, por lo que no tendría que producir una gran cantidad del mismo en días cercanos al reconocimiento sino que secretaría pequeñas cantidades, fundamentalmente en sus etapas iniciales, para estimular la secreción oviductal y quizás uterina de IGF-I y así ayudar en su crecimiento y diferenciación de una manera paracrina. Bajo esta hipótesis el efecto benéfico de la rbST en vacas infértiles sería el resultado de subsanar la carencia de IGF-I oviductal/uterino debida a una deficiencia en la síntesis ya sea del estradiol embrionario o bien del IGF-I materno en respuesta al estradiol.

También existe la posibilidad de que dicho efecto no sea debido a una eventual normalización de niveles deprimidos de IGF-I sino simplemente a que la elevación de dichos niveles, provocada por el tratamiento con rbST, represente un estímulo para un embrión que intenta desarrollarse en un ambiente uterino inadecuado provocado por alguno de los agentes causales de mortalidad embrionaria mencionados en un principio.

En otro trabajo previo, Rodríguez (1999) aplicó la rbST al día 3 y al 17 post-inseminación y no pudo aumentar el índice de concepción de vacas Holstein tanto de primer servicio como repetidoras, lo que confirmaría la importancia del momento en que se inicia el tratamiento, quizás debido a que el IGF-I estimula la maduración de los embriones principalmente hasta la etapa de mórula (Matsui *et al.*, 1995), la cual se alcanza hasta el día 5-6 (Robertson y Nelson, 1998), por lo que si el tratamiento es aplicado al día 3, los niveles elevados de IGF-I se alcanzarían precisamente por el día 5 (Gong *et al.*, 1993^A), lo cual parece ser demasiado tarde como para provocar un efecto.

Por otra parte, las disfunciones lúteas han sido señaladas como causa de infertilidad en los bovinos (Kimura *et al.*, 1987; Shelton *et al.*, 1990). En nuestro primer trabajo (Morales, 1993) se observó un aumento marginal en los niveles de progesterona, sin embargo, en los tres experimentos del presente trabajo, en el de Mendoza (2000) y en aquel en donde la rbST se aplicó al día 3 post-estro (Rodríguez, 1999) no fue posible reproducir este aumento y tampoco aumentó el tamaño del cuerpo lúteo al día 7 y 10 post-estro, lo que nos lleva a pensar que el efecto de la rbST sobre la fertilidad y calidad embrionaria es independiente a un eventual aumento en las concentraciones de dicha hormona, lo que coincide con trabajos como los de Bulman y Lamming (1978), Sreenan y Diskin (1983), Hernández *et al.* (1992) y Morales *et al.* (2000), en donde la fertilidad tampoco estuvo relacionada con los niveles de progesterona, o el de Linares *et al.* (1982) en donde tampoco se encontró la relación calidad embrionaria-niveles de progesterona en los primeros 7 días post-estro.

En términos prácticos hemos demostrado que el tratamiento aplicado en el estro mejora la calidad embrionaria (capítulo 5) y el índice de concepción (Morales, 1993; Mendoza, 2000) de vacas Holstein repetidoras. El hecho de que los resultados de ambos trabajos sean similares a pesar de que en el primero se repitió la dosis al día 10 post-estro establece que el efecto es logrado con la primera aplicación, quizás debido a que las anomalías y pérdidas embrionarias

ocurren principalmente en los primeros siete días post-inseminación en este tipo de vacas y por el ya mencionado efecto benéfico del IGF-I notado solo hasta la etapa de mórula.

Otro punto interesante radica en el hecho de que, por condiciones prácticas, desde el primer trabajo (Morales, 1993) el tratamiento con rbST se aplicó una vez que la hembra fue detectada en estro, sin embargo, existe la posibilidad de que pueda obtenerse un efecto aún mayor si el mismo es aplicado con anterioridad. Los reportes de una mejor calidad embrionaria en hembras fértiles superovuladas y tratadas con rbST días antes de la inseminación apoyarían esta hipótesis. Como ya se mencionó Kuehner *et al.* (1993) lograron aumentar el porcentaje de embriones transferibles a 74.6% contra 58.6% del grupo testigo, Herrler *et al.* (1994) de 95.7% contra 77.7% y Gong *et al.* (1995; 1996) de 92.4% contra 66.8% aproximadamente. Por su parte, en el caso de los animales infértiles existe la posibilidad de que pueda obtenerse un doble beneficio, al actuar el IGF-I tanto en la maduración de los ovocitos como en el mejoramiento del medio oviductal-uterino para el mejor desarrollo del embrión.

Trabajos subsecuentes deberán enfocarse a determinar los efectos del tratamiento con rbST sobre los niveles de IGF-I y sus proteínas de enlace en oviducto y útero a diferentes periodos post-aplicación en vacas infértiles, así como establecer la dinámica de la síntesis de estradiol por parte del embrión y su relación con dichos niveles.

Se concluye que la administración de 500 mg de rbST al inicio del estro mejora la calidad embrionaria de vacas repetidoras superovuladas pero no así de las vacas de primer servicio y que no afecta ni el número de embriones obtenidos ni los niveles de progesterona circulante de ambos tipos de hembras. Tampoco modifica las concentraciones de estradiol 17 β del día del estro, progesterona hasta el día 10, tiempo de ovulación, diámetro del folículo ovulatorio ni del cuerpo lúteo de vaquillas.

Capítulo 7. Referencias

- 1-Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, May JV, Knecht M, Svoboda ME *et al.* Insulin-like growth factor-I as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1988^A; 122: 1583-1591.
- 2-Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insulin-like growth factor-I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1988^B; 122: 194-201.
- 3-Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Somatomedin-C enhances induction of luteinizing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1985; 116: 2369-2375.
- 4-Adler HC. Genital vibriosis in the bovine. An Experimental study of early embryonic mortality. *Acta Vet Scand* 1959; 1: 1-11.
- 5-Albihn A, Gustaffsson H, Rodríguez-Martínez H, Larsson K. Development of day 7 bovine demi-embryos transferred into virgin and repeat-breeder heifers. *Anim Reprod Sci* 1989; 21: 161-176.
- 6-Archibald LF, Sumrall DP, Tran T, Klapstein E, Risco C, Chavette P. Comparison of pregnancy rates of repeat-breeder dairy cows given gonadotropin releasing hormone at or prior to the time of insemination. *Theriogenology* 1993; 39: 1081-1091.
- 7-Asimov GJ, Krouze NK. The lactogenic preparations from the anterior pituitary and the increase of milk yield in cows. *J Dairy Sci* 1937; 20: 289.
- 8-Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fertil* 1978; 54: 483-493.
- 9-Ayalon N. Embryonic mortality in cattle. *Zuchthyg* 1981; 16: 97-109.

- 10-Bartlett PL. Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology* 1986; 26: 309-322.
- 11-Bascom SS, Young AJ. A summary of the reasons why farmers cull cows. *J Dairy Sci* 1998; 81:2299-2305.
- 12-Bauman DE. Bovine somatotropin: Review of an emerging animal technology. *J Dairy Sci* 1992; 75: 3432-3451.
- 13-Baumrucker CR, Stemberger BH. Insulin and insulin-like growth factor-I stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue *in vitro*. *J Anim Sci* 1989; 67: 3503.
- 14-Bavister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 1988; 29: 143-154.
- 15-Bazer FW, Vallet JL, Roberts RM, Sharp DC, Thatcher WW. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 841-850.
- 16-Berger G. Effect of the treatment with HCG or GnRH on conception rate of cows inseminated for the third time. *Monatshefte Für Veterinär Medizin* 1988; 43: 221-223.
- 17-Bigelow KL, Evans ACO, Fortune JE. Effects of prolonged dominance on follicular steroidogenesis in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 142.
- 18-Blanchard T, Ferguson J, Love L, Takeda T, Henderson B, Hasler J. Effect of dietary crude protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Am J Vet Res* 1990; 51: 905-908.
- 19-Blundell TL, Humbell RE. Hormone families: Pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 1989; 287: 781-787.
- 20-Bols PEJ, Ysebaert MT, Lein A, Coryn M, Van Soom A, De Kruif A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. *Theriogenology* 1998; 49: 983-995.

- 21-Bondurant RH, Revah I, Franti C, Harman RJ, Hird D, Klinborg D *et al.*. Effect of gonadotropin releasing hormone on fertility in repeat breeder California dairy cows. *Theriogenology* 1991; 35: 365-374.
- 22-Bostedt H. Delayed ovulation as a cause of sterility in the AI of cattle. *Memorias del 8th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*; 1976; Krakow, Poland: 552-554.
- 23-Bowen RA, Eldsen RP, Seidel GE. Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *Am J Vet Res* 1985; 46: 1095-1097.
- 24-Bulman DC, Lamming GE. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *J Reprod Fertil* 1978; 54: 447-458.
- 25-Buratini J, Price CA, Bó GA, Mello MRB, Assumpção MEOA, Tavares LMT *et al.*. Effect of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin on follicular dynamics in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology* 1999; 51: 402.
- 26-Butler WR, Calaman JJ, Beam SW. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J Anim Sci* 1996; 74: 858-865.
- 27-Campbell BK, Gordon BM, Dobson H, Scaramuzzi RJ. Insulin-like growth factor can stimulate oestradiol production both *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1993; Abstract series 12: abstract 21.
- 28-Carroll DJ, Barton BA, Anderson GW, Smith RD. Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1988; 71: 3470-3481.
- 29-Carson RS, Zhang Z, Hutchinson LA, Herington AC, Findlay JK. Growth factors in ovarian function. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 735-746.
- 30-Cohick WS, McGuire MA, Clemmons DR, Bauman DE. Regulation of insulin-like growth factor-binding proteins in serum and lymph of lactating cows by somatotropin. *Endocrinology* 1992; 130: 1508-1514.

- 31-Cole WJ, Madsen KS, Hintz RL, Collier RJ. Effect of recombinantly-derived bovine somatotropin on reproductive performance of dairy cattle. *Theriogenology* 1991; 36: 573-595.
- 32-Committee on Reproductive Nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet* 1972; 62: 216-237.
- 33-Corbel MJ. Fungal infectious agents. In: Laing JA, Brinley Morgan WJ, Wagner WC, editors. *Fertility and infertility in Veterinary Practice*. London: Bailliere Tindall, 1988: 228-233.
- 34-Corps AN, Brown KD. Ligand-receptor interactions involved in the stimulation of swiss 3T3 fibroblast by insulin-like growth factors and insulin. *Biochem J* 1988; 252: 119-125.
- 35-Croy BA, Betteridge KJ, Chapeau C, Beriault R, Johnson WH, King GJ. Assesment of immunoregulation by cultured pre-attachment bovine embryos. *J Reprod Immunol* 1988; 14: 9-25.
- 36-Cunningham EP. The use of bovine somatotropin in milk production- A review. *Irish Vet J* 1994; 47: 207-210.
- 37-Chalupa W, Vecchiarelli B, Galligan DT, Ferguson JD, Baird LS, Hemken RW, *et al.* Responses of dairy cows supplemented with somatotropin during weeks 5 through 43 of lactation. *J Dairy Sci* 1996; 79: 800-812.
- 38-Chen CW, Roy D. Up-regulation of nuclear IGF-I receptor by short term exposure of stilbene estrogen, diethylstilbestrol. *Moll Cell Endocrinol* 1996; 118: 1-8.
- 39-Dalton JC, Marcinkowski DP. Effect of sometribove administration on LH concentration in dairy cattle. *Theriogenology* 1994; 41: 437-445.
- 40-Davoren JB, Hsueh AJW. Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin C/insulin-like growth f actor I *in vivo*. *Endocrinology* 1986; 118: 888-890.
- 41-De Almeida AP. Early embryonic mortality in repeat-breeder cows. *ARS Vet* 1995; 11:18-34.

- 42-De Boer G, Kennelly JJ. Insulin-like growth factor-I induction in response to exogenous somatotropin. *J Dairy Sci* 1990; 73 (suppl. 1): 136.
- 43-De Moura MD, Choi D, Adashi EY, Payne DW. Insulin-like growth factor-I-mediated amplification of follicle stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: Enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression. *Biol Reprod* 1997; 56: 946-953.
- 44-Díaz VO. Análisis de la información publicada sobre la fertilidad obtenida con el uso de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) al momento de la inseminación artificial en vacas lecheras (tesis de licenciatura), México DF. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Nacional Autónoma de México, 1995.
- 45-Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 463-468.
- 46-Donis RO. Bovine viral diarrhea: The unraveling of a complex of clinical presentations. *Bov Proceed* 1988; 20: 16-22.
- 47-Eden JA, Jones J, Carter GD, Alagband-Zadeh J. Does serum insulin-like growth factor I (IGF-I) have an endocrine role in the control of follicular function? *J Endocr* 1988; 119: 163.
- 48-El-Azab MA, Labib FM, Sharawy SM, El-Azab EA. Injection of gonadotropin releasing hormone (GnRH) immediately following artificial insemination to improve reproductive efficacy of repeat breeder cows. *J Egypt Vet Med Assoc* 1987; 47: 291-297.
- 49-Ellis WA, Thiermann AB. Isolation of leptospirosis from the genital tracts of Iowa cows. *Am J Vet Res* 1986; 47: 1694-1696.
- 50-Elrod CC, Butler WR. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J Anim Sci* 1993; 71: 694-701.
- 51-Elrod CC, Van Amburgh M, Butler WR. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J Anim Sci* 1993; 71: 702-706.

- 52-Eppard PJ, Bauman DE, Curtis CR, Erb HN, Lanza GM, DeGeeter MJ. Effect of 188 day treatment with somatotropin on health and reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1987; 70: 582-591.
- 53-Erb, RE, Garverick HA, Randel RD, Brown BL, Callahan CJ. Profiles of reproductive hormones associated with fertile and non-fertile inseminations of dairy cows. *Theriogenology* 1976; 5: 27-41.
- 54-Ferguson JD, Galligan DT, Blanchard T, Reeves M. Serum urea nitrogen and conception rate: The usefulness of test information. *J Dairy Sci* 1993; 76: 3742-3746.
- 55-Fisher SJ, Gimenez T, Henricks DM. Immunosuppressive activity associated with early pregnancy in the bovine. *Biol Reprod* 1985; 32: 894-906.
- 56-Fortune JE, Quirk SM. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci* 1988; 66 (suppl. 2): 1-8.
- 57-Fukui Y, Kobayashi M, Tsubaki M, Kikuchi N, Ono H. Regulation estrus and therapy of repeat breeder and anestrous Holstein heifers using progesterone releasing intravaginal devices (PRID's). *Jap J Vet Sci* 1985; 47: 943-950.
- 58-Funston RN, Seidel GE, Klindt J, Roberts AJ. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1996; 55: 1390-1396.
- 59-Gaines JD. The role of record analysis in evaluating subfertile dairy herds. *Vet Med* 1989; 84: 532-543.
- 60-Gallo GF, Block E. Effects of recombinant bovine somatotropin on hypophyseal and ovarian functions of lactating dairy cows. *Can J Anim Sci* 1991; 71: 343-353.
- 61-Gandolfi F, Pocar P, Luciano AM, Rieger D. Effects of EGF and IGF-I during in-vitro maturation of cattle oocytes on subsequent embryo development and metabolism. *Theriogenology* 1996; 45: 277.
- 62-Gandolfi F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 1994; 41: 95-100.

- 63-García E. Modificación al sistema de clasificación climática de Köpen. 4a. ed. México DF: Instituto de Geografía-UNAM, 1987.
- 64-García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía UNAM, 1973.
- 65-Garverick HA, Zollers WG, Smith MF. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *J Anim Sc* 1986; 62 (suppl. 2): 92-105.
- 66-Geisert RD, Zavy MT, Biggers BG, Garret JE, Wettemann RP. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. *Anim Reprod Sci* 1988^A; 16: 11-25.
- 67-Geisert RD, Zavy MT, Biggers BG. Effect of heat stress on conceptus: A uterine secretion in the bovine. *Theriogenology* 1988^B; 29: 1075-1082.
- 68-Geshi M, Sakaguchi M, Yonai M, Nagai T, Suzuki O, Hanada H. Effects of the 7/21 Robertsonians translocation of bull on fertility and development of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 1994; 41:205.
- 69-Gill J. Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences. Vol 1, Iowa: Iowa State University Press, 1978.
- 70-Giudice LC. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 1992; 13: 641-669.
- 71-Gong JG, Bramley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod* 1991; 45: 941-949.
- 72-Gong JG, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fertil* 1993^A; 97: 247-254.
- 73-Gong JG, Bramley TA, Wilmut I, Webb R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol Reprod* 1993^B; 48: 1141-1149.

- 74-Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R. Effects of recombinant somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *J Endocrinol* 1994; 143: 157-164.
- 75-Gong JG, Wilmut I, Bramley TA, Webb R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 1996; 45: 611-622.
- 76-Gong JG, Wilmut I, Bramley TA, Webb R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 1995; 43: 221.
- 77-Gray B, Stringfellow D, Riddell M, Riddell K, Davenport G, Wright J. The effect of treatment with bovine somatotropin (BST) on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 1993; 39: 227.
- 78-Gustafsson H, Larson k, Kindahl H, Majed A. Sequential endocrine changes and behaviour during oestrus and metoestrus in repeat breeder and virgin heifers. *Anim Reprod Sci* 1986; 10: 261-273.
- 79-Gustafsson H. Characterization of embryos from repeat breeder and virgin heifers. *Theriogenology* 1985; 23: 487-498.
- 80-Haour F, Saxena BB. Characterization and solubilization of gonadotrophin receptor of bovine corpus luteum. *J Biol Chem* 1974; 249: 2195.
- 81-Harden KK, Robinson JL. Deficiency of UMP synthase in dairy cattle: A model for hereditary orotic aciduria. *J Inherit Metab Dis* 1987; 10: 201-209.
- 82-Hawk HW, Brisfield TH, Turner GD, Withmore GW, Norcross MA. The effect of ovarian status on induced acute inflammatory responses in cattle uteri. *Am J Vet Res* 1964; 25: 362-366.
- 83-Henricks DM, Lamond DR, Hill JR, Dickey JF. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. *J Anim Sci* 1971; 33: 450-454.

- 84-Hernandez ER, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ, Payne DW, Adashi EY. Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology* 1988; 122: 1603-1612.
- 85-Hernández J, Zarco L, Lima V. Niveles de progesterona plasmática durante los primeros siete días posinseminación en vaquillas Holstein repetidoras y de primer servicio. *Vet Mex* 1992; 23: 189-192.
- 86-Hernández-Cerón J, Zarco L, Lima-Tamayo V. Incidence of delayed ovulation in Holstein heifers and its effects on fertility and early luteal function. *Theriogenology* 1993; 40: 1073-1081.
- 87-Herrler A, Einspanier R, Schams D, Niemann H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: A preliminary study. *Theriogenology* 1994; 41: 601-611.
- 88-Herrler A, Farries E, Niemann H. A trial to stimulate insulin like growth factor I levels to improve superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 1990; 33: 248.
- 89-Hill DJ. Growth factors and their cellular actions. *J Reprod Fertil* 1989; 85: 723-734.
- 90-Humblot P, Saumande J. Uses of GnRH in the stimulation of reproductive function in domestic ruminants. *Contracept Fertil Sex* 1993; 21: 766-772.
- 91-Hunter RHF. Fertility in cattle: basic reasons why late insemination must be avoided. *Anim Breed Abst* 1985; 54: 83-87.
- 92-Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their bindings proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16:3.
- 93-Jordan ER, Chapman TE, Holtan DW, Swanson LV. Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1854.

- 94-Jordan ER, Swanson LV. Effect of crude protein on reproductive efficiency, serum total protein and albumin in the high producing dairy cow. *J Dairy Sci* 1979^A; 66: 1854.
- 95-Jordan ER, Swanson LV. Serum progesterone and luteinizing hormone in dairy cattle fed varying levels of crude protein. *J Anim Sci* 1979^B; 48: 1154-1158.
- 96-Jub TF, Abhayaratne D, Malmo J, Anderson GA. Failure of an intramuscular injection of an analogue of gonadotrophin releasing hormone (buserelin) at 11-13 days post-insemination to increase pregnancy rates in dairy cattle. *Aust Vet J* 1990; 67: 359-361.
- 97-Kaneene JB, Coe PH, Gibson CD, Yamini B, Martinez RO, Morrow DA. The role of *Haemophilus somnus* in bovine early embryonic death. I. The effect of the organism on embryos by day 8 postbreeding. *Theriogenology* 1986; 26: 189-198.
- 98-Kawarsky SJ, Basrur PK, Stubbings RB, Hansen PJ, King WA. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biol Reprod* 1996; 54: 53-59.
- 99-Keller ML, Roberts AJ, Seidel GE. Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in the uterus and conceptus during early conceptus elongation in cattle. *Biol Reprod* 1998; 59: 632-642.
- 100-Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 703-714.
- 101-Kimura M, Nakao T, Moriyoshi M, Kawata K. Luteal phase deficiency as a possible cause of repeat breeding dairy cows. *Br Vet J* 1987; 145: 560-566.
- 102-King WA. Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 1990; 34: 229-250.
- 103-Kirby C, Smith MF, Keisler DH, Lucy MC. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J Dairy Sci* 1997^A; 80: 273-285.

- 104-Kirby CJ, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Lucy MC. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and-3 genes in bovine uterus, ovary and oviduct. *Biol Reprod* 1996; 55:996-1002.
- 105-Kirby CJ, Wilson SJ, Lucy MC. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F₂ α . *J Dairy Sci* 1997^B; 80: 286-294.
- 106-Kuehner LF, Rieger D, Walton JS, Zhao X, Johnson WH. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 1003-1013.
- 107-Lamming GE, Darwash AO, Back HL. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. *J. Reprod Fertil* 1989; 37: 245-252.
- 108-Lee CN, Maurice E, Ax RL, Pennington JA, Hoffman WF, Brown MD. Efficacy of gonadotropin releasing hormone administered at the time of artificial insemination of heifers and postpartum and repeat breeder dairy cows. *Am J Vet Res* 1983 ; 44 : 2160-2163.
- 109-Lefebvre DM, Block E. Effect of recombinant bovine somatotropin on estradiol-induced estrous behavior in ovariectomized heifers. *J Dairy Sci* 1992; 75: 1461-1464.
- 110-Lieberman J, Schams D, Miyamoto A. Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during the oestrus cycle and pregnancy *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 1003-1011.
- 111-Liebermann J, Schams D. Actions of somatotrophin on oxytocin and progesterone release from the microdialysed bovine corpus luteum *in vitro*. *J Endocrinol* 1994; 143: 243-250.
- 112-Linares T. Embryonic development in repeat breeder and virgin heifers seven days after insemination. *Anim Reprod Sci* 1982; 4: 189-198.

- 113-Linares T, Larsson K, Edqvist LE. Plasma progesterone levels from oestrus through day 7 after AI in heifers carrying embryos with normal or deviating morphology. *Theriogenology* 1982; 17: 125-132.
- 114-Littell RC, Henry PR, Ammerman CB. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci* 1998; 76: 1216-1231.
- 115-Lorenzo P, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 697-701.
- 116-Low BG, Hansen PJ. Actions of steroids and prostaglandins secreted by the placenta and uterus of the cow and ewe on lymphocyte proliferation *in vitro*. *Am J Reprod Immunol* 1988; 18: 71-75.
- 117-Lucy MC, Byatt JC, Curran TL, Curran DF, Collier RJ. Placental lactogen and somatotropin: Hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and function of the ovary in heifers. *Biol Reprod* 1994^A; 50: 1136-1144.
- 118-Lucy MC, Collier RJ, Kitchell ML, Dibner JJ, Hauser SD, Krivi GG. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol Reprod* 1993; 48: 1219-1227.
- 119-Lucy MC, Curran TL, Collier RJ, Cole WJ. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology* 1994^B; 41: 561-572.
- 120-Lucy MC, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Ko Y, Savio JD, Badinga L. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 1995; 12: 73-82.
- 121-Macmillan KL, Taufa VK, Day AM, Peterson AJ. Effects of supplemental progesterone on pregnancy rates in cattle. *J Reprod Fertil* 1991; 43: 304.

- 122-Macmillan KL, Taufa VK, Day AM. Effects of an agonist of gonadotrophin releasing hormone (buserelin) in cattle. III. Pregnancy rates after a postinsemination injection during metoestrus or dioestrus. *Anim Reprod Sci* 1986; 11: 1-10.
- 123-Makarevich AV, Sirotkin AV. The involvement of the GH/IGF-I axis in the regulation of secretory activity by bovine oviduct epithelial cells. *Anim Reprod Sci* 1997; 48: 197-207.
- 124-Malayer JR, Hansen PJ. Differences between Brahman and Holstein cows in heat-shock induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. *J Anim Sci* 1990; 68: 266-280.
- 125-Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized *in vitro*. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 1109-1111.
- 126-Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology* 1997; 48: 605-616.
- 127-Maurer RR, Chenault JR. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. *J Anim Sci* 1983; 56: 1186-1189.
- 128-McClure TJ. An experimental study of the causes of a nutritional and lactational stress infertility of pasture-fed cows, associated with loss of body weight at about the time of mating. *Res Vet Sci* 1970; 11: 247-254.
- 129-McClure TJ. Hypoglycaemia, an apparent cause of infertility of lactating cows. *Br Vet J* 1968; 124: 126-130.
- 130-McCusker RH. Controlling insulin-like growth factor activity and the modulation of insulin-like growth factor binding protein and receptor binding. *J Dairy Sci* 1998; 81: 1790-1800.
- 131-McFeely RA, Klunder LR, Reed JA. A 14/20 chromosome translocation in simmental cattle. *JAVMA* 1993; 202: 619-620.

132-Miilvae RA, Hinckley ST, Carlson JC. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996; 45: 1327-1349.

133-Mendoza MG. Efecto de un tratamiento corto de rbST al momento de la inseminación artificial en la fertilidad de vacas repetidoras y de primer servicio (tesis de maestría). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2000

134-Monnaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology* 1997; 47: 3-12.

135-Morales RJS, Hernández CJ, Vázquez GJA. Efecto del tratamiento con hCG al momento de la inseminación sobre la función del cuerpo lúteo y fertilidad de vacas Holstein repetidoras. *Vet Mex* 1998; 29: 269-272.

136-Morales RS, Hernández CJ, Rodríguez TG, Peña FR. Comparación del porcentaje de concepción y la función lútea en vacas de primer servicio, vacas repetidoras y vaquillas Holstein. *Vet Mex* 2000; 31: 179-184.

137-Morales RJS. Efecto de un tratamiento corto de rbST (Lactotropina) sobre la fertilidad de vacas Holstein repetidoras (tesis de maestría). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.

138-Moses AC, Nissley SP, Shorth PA, Rechler MM, White RM, Knight AB, Higa OZ. Elevated levels of insulin-like growth multiplication stimulating activity in fetal rat serum. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1980; 77: 3649.

139-Murphy LJ, Friesen HG. Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized hipophysectomized rat. *Endocrinology* 1988; 122: 325-332.

140-Norstedt G, Levinovitz A, Eriksson H. Regulation of uterine insulin-like growth factor I mRNA and insulin-like growth factor II mRNA by estrogen in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 1989; 120: 466-472.

- 141-Nytes AJ, Combs DK, Shook GE, Shaver RD, Cleale RM. Response to recombinant bovine somatotropin in dairy cows with different genetic merit for milk production. *J Dairy Sci* 1990; 73: 784-791.
- 142-Oh YM, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E, Rosenfeld RG. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7-recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and IGF-II. *J Biol Chem* 1996; 271: 30322-30325.
- 143-Palma GA, Zakhartchenko V, Wolf E, Brem G. Effect of insulin-like growth factor-I on early development of *in vitro* produced bovine embryos. *Biol Reprod* 1995; 52 (suppl. 1): 90.
- 144-Pavlok A, Koutecká L, Krejčí P, Slavík T, Cerman J, Slaba J, *et al.*. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. *Anim Reprod Sci* 1996; 41: 183-192.
- 145-Peel CJ, Bauman DE. Somatotropin and lactation. *J Dairy Sci* 1987; 70: 474-486.
- 146-Peterson AJ, Donnison MJ, Pearson S, McMillan WH. Contrasting early development in a herd of recipient cattle with previously high or low pregnancy rates. *Theriogenology* 1999; 51: 229.
- 147-Phatak AP, Withmore HL, Brown MD. Effect of gonadotropin releasing hormone on conception rate in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology* 1986; 26: 605-609.
- 148-Plym K, Anderson L, Pehrson B. The relationships between the fertility of dairy cows and clinical and biochemical measurements, with special reference to plasma glucose and milk acetone. *J Vet Med A* 1991; 38: 608-616.
- 149-Prelle K, Boxhammer K, Stoojkovic M, Wolf E. Effects of insulin-like growth factor-I and its analogues on IGF-binding protein gene expression in preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 1999; 51: 189.

- 150-Pulido A, Zarco L, Galina CS, Murcia C, Flores G, Posadas E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 1991; 35: 965-975.
- 151-Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Biol Reprod* 1986; 34: 100.
- 152-Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 postinsemination. *Theriogenology* 1988^A; 30: 195-209.
- 153-Putney DJ, Malayer JR, Gross TS, Thatcher WW, Hansen PJ, Drost M. Heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. *Biol Reprod* 1988^B; 39: 717-728.
- 154-Rajamahendran R, Sianangama PC. Effect of human chorionic gonadotrophin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 577-584.
- 155-Rao AVN. Gonadotropin releasing hormone therapy in anoestrous, repeat breeding and follicular cystic cows. *Indian Vet J* 1991; 68: 267-270.
- 156-Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1998; 112: 123-130.
- 157-Rieger D, Walton JS, Goodwin ML, Johnson WH. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin (rBST) on the superovulatory response in Holstein heifers. *Theriogenology* 1990; 33: 306.

- 158-Rieger D, Walton JS, Goodwin ML, Johnson WH. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 1991; 35: 863-868.
- 159-Roberts RM, Bazer FW. The functions of uterine secretions. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 875-892.
- 160-Roberts RM, Farin CE, Leaman DW. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr Rev* 1992; 13: 432-452.
- 161-Roberts RM. Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology* 1990; 33: 175-183.
- 162-Robertson I, Nelson RE. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow DA, Seidel SM, editors. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy, Illinois: International Embryo Transfer Society, Inc., 1998: 103-116.
- 163-Robinson NA, Leslie EK, Walton JS. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *J Dairy Sci* 1989; 72: 202-207.
- 164-Rodríguez TGR. Efecto de la administración de somatotropina bovina recombinante (rbST) los días 3 y 17 postinseminación sobre la fertilidad y la función del cuerpo lúteo en vacas Holstein de primer servicio y repetidoras (tesis de maestría). México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1999.
- 165-Romero A, Albert J, Brink Z, Seidel GE. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. *Theriogenology* 1991; 35: 265.
- 166-Roussel JD, Beatty JF, Koonce K. Gonadotropin releasing hormone therapy in functional infertility of dairy cattle. *Theriogenology* 1988; 30: 1115-1119.
- 167-Ruhnke RL, Palmer NC, Doig PA, Miller RB. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*. *Theriogenology* 1989; 21: 295-301.

- 168-Sakaguchi M, Dominko T, Leibfried-Rutledge MI, Nagai T, First NL. Effects of a combination of EGF and IGF-I on polar body extrusion and developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 1997; 47: 200.
- 169-Sauerwein H, Miyamoto A, Günther J, Meyer HHD, Schams D. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 103-115.
- 170-Schem SR, Deaver DR, Griel LC, Muller LD. Effects of recombinant bovine somatotropin on lutenizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biol Reprod* 1990; 42: 815-821.
- 171-Schmidt A, Einspanier R, Amselgruber W, Sinowartz F, Schams D. Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the bovine oviduct during the oestrus cycle. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102: 364-369.
- 172-Schmutz SM, Moker JS, Barth AD, Mapletoft RJ. Embryonic loss in superovulated cattle caused by the 1:29 Robertsonian translocation. *Theriogenology* 1991; 35: 705-714.
- 173-Schmutz SM, Moker JS, Pawlyshyn V, Haugen B, Clark EG. Fertility effects of the 14:20 Robertsonian translocation in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 815-823.
- 174-Schultz GA, Hogan A, Watson AJ, Smith RM, Heyner S. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 1992; 4: 361-371.
- 175-Semambo DKN, Ayliffe TR, Boyd JS, Tatlor DJ. Early abortion in cattle induced by experimental intrauterine infection with pure cultures of *Actinomyces pyogenes*. *Vet Rec* 1991; 129: 12-16.
- 176-Shanks RD, Robinson JL. Embryonic mortality attributed to inherited deficiency of uridine monophosphate synthase. *J Dairy Sci* 1989; 72: 3035-3039.
- 177-Shelton K, Gayerie De Abreu MF, Hunter MG, Parkinson TJ, Lamming GE. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 1-10.

- 178-Shemesh M, Ayalon N, Linder HR. Early effects of conceptus on plasma progesterone levels in the cow. *J Reprod Fertil* 1968; 15: 161-164.
- 179-Shimasaki S, Ling N. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1,-2,-3,-4,-5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 1991; 3: 243-266.
- 180-Sianangama PC, Rajamahendran R. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. *Theriogenology* 1992; 38: 85-96.
- 181-Simmen FA, Simmen RCM, Geisert RD, Martinat-Botte F, Bazer FW, Terqui M. Differential expression during the estrous cycle and pre- and postimplantation conceptus development of messenger ribonucleic acids encoding components of the pig uterine insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 1992; 130: 1547-1556.
- 182-Simmen RCM, Ko Y, Simmen FA. Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology* 1993; 39: 163-175.
- 183-Simpson RB, Chase CC, Spicer LJ, Carroll JA, Hammond AC, Welsh TJ. Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein activity and metabolites in ovariectomized angus and brahman cows. *Domest Anim Endocrinol* 1997; 14: 367-380.
- 184-Sirotkin AV, Taradajnik TE, Makarevich AV, Bulla J. Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. *Anim Reprod Sci* 1998; 51: 333-344.
- 185-Skirrow SZ, BonDurant H. Induced *Tritrichomonas foetus* infection in beef heifers. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196: 885-889.
- 186-Spicer LJ, Alpizar E, Echtenkamp SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production and (or) insulin-like growth factor production *in vitro*. *J Anim Sci* 1993; 71: 1232-1241.

187-Spicer LJ, Echternkamp SE. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 1995; 12: 223-245.

188-Spicer LJ, Enright WJ. Concentrations of insulin-like growth factor I and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarian follicles: Effect of daily injections of a growth hormone-releasing factor analog and (or) thyrotropin-releasing hormone. *J Anim Sci* 1991; 69: 1133-1139.

189-Spicer LJ, Stewart RE. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: Role of IGF-I receptors. *Biol Reprod* 1996; 54: 255-263.

190-Spicer LJ, Tucker WB, Adams GD. Insulin-like growth factor-I in dairy cows: Relationships among energy balance, body condition, ovarian activity and estrous behavior. *J Dairy Sci* 1990; 73: 929-937.

191-Sreenan JM, Diskin MG. Early embryonic mortality in the cow; its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec* 1983; 112: 517-521.

192-Stevenson JS, Call EP, Scoby RK, Phatak AP. Double insemination and gonadotropin-releasing hormone treatment of repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 1990; 73: 1766-1772.

193-Swason LV, Young AJ. Failure of gonadotropin releasing hormone or human chorionic gonadotropin to enhance the fertility of repeat breeder cows when administered at the time of insemination. *Theriogenology* 1990; 34: 955-963.

194-Tanabe TY, Casida LE. The nature of reproductive failure of cows of low fertility. *J Dairy Sci* 1949; 32: 237-246.

195-Tavakkol A, Simmen FA, Simmen RC. Porcine insulin-like growth factor-I (pIGF-I): complementary deoxyribonucleic acid cloning and uterine expression of messenger ribonucleic acid encoding evolutionary conserved IGF-I peptides. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 674-681.

- 196-Taylor C, Rajamahendran R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. *J Dairy Sci* 1991; 74: 115-123.
- 197-Thatcher WW, Binelli M, Burke J, Staples CR, Ambrose JD, Coehho. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology* 1997; 47: 131-140.
- 198-Thatcher WW, Drost M, Savio JD, McMillan KL, Entwistle KW, Schmitt EJ, De la Sota RL, Morris GR. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim Reprod Sci* 1993; 33: 27-49.
- 199-Thatcher WW, McMillan KL, Hansen PJ, Drost M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 1989; 31: 149-164.
- 200-Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt EP. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J Anim Sci* 1994; 72 (suppl. 3): 16-30.
- 201-Torres C, Valencia G. Caracterización de la fertilidad en vacas Holstein con diferente número de servicios en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo (tesis de licenciatura), Edo. de México, México. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. UNAM, 1995.
- 202-Urióstegui M. Empleo del acetato de fertilérin (análogo del GnRH) al momento de la inseminación artificial en la vaca repetidora (tesis licenciatura). México DF. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, 1990.
- 203-Van Cleef J, Drost M, Thatcher WW. Effects of postinsemination on fertility and subsequent estrous responses of dairy heifers. *Theriogenology* 1991; 36: 795-807.
- 204-Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 1988; 71: 1063-1072.

- 205-Wagh AJ, Hukeri UB, Deshpande BR. Repeat breeder crossbred cows and remedial measures thereon. *Livestock Adviser* 1991; 16: 3-6.
- 206-Walton JS, Halbert GW, Robinson NA, Leslie KE. Effects of progesterone and human chorionic gonadotropin administration five days postinsemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Can J. Vet Res* 1990; 54: 305-308.
- 207-Waterman DF, Silvia WJ, Hemken RW, Heersche G, Swenson TS, Eggert RG. Effect of bovine somatotropin on reproductive function in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1993; 40: 1015.
- 208-Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Wiemer HE, Schultz GA. Expression of growth factor ligand the receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 87-95.
- 209-Watson ED. Oponising ability of bovine uterine scretions during the oestrous cycle. *Vet Rec* 1985; 117: 274-275.
- 210-Wiebold JL. Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows. *J Reprod Fertil* 1988; 84: 397-399.
- 211-Winger QA, de los Rios P, Ham VKM, Armstrong DT, Hill DJ, Watson AJ. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: Possible regulators of embryotrophic insulin-like growth factor circuits. *Biol Reprod* 1997; 56: 1415-1423.
- 212-Wood DC, Salsgiver WJ, Kasser TR, Lange GW, Rowold E, Violand BN *et al.*. Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. *J Biol Chem* 1989; 264: 14741.
- 213-Yallampalli C, Rajaraman S, Nagamani M. Insulin-like growth factor binding proteins in the rat uterus and their regulation by oestradiol and growth hormone. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 501-505.
- 214-Young A, Swason E. Effect of GnRH or hCH at time of insemination of repeat breeder cows. *J Dairy Sci* 1988; 71 (suppl 1): 137.

215-Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15: 55-63.

216-Yuan W, Lucy MC. Messenger ribonucleic acid expression for growth hormone receptor, luteinizing hormone receptor and esteroidogenic enzymes during the estrous cycle and pregnancy in porcine and bovine corpora lutea. *Domest Anim Endocrinol* 1996; 13: 431-444.

217-Zavy MT. Embryonic mortality in cattle. In: Zavy MT, Geisert RD, editors. *Embryonic mortality in domestic species*. Boca Raton: CRC Press, 1994: 99-140.