

01674

17



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

FACTIBILIDAD DE PRODUCIR EMBRIONES CON VAQUILLAS BRAHMAN (Bos indicus) EN CONDICIONES TROPICALES.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JUAN RAMON PAEZ GARFIAS

TUTOR PRINCIPAL: DR. HECTOR BASURTO CAMBEROS

COMITE TUTORAL:

DR. CARLOS GALINA HIDALGO

DR. HECTOR SUMANO LOPEZ



MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DECLARACION

El autor da consentimiento a la división de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis este disponible para cualquier tipo de intercambio bibliotecario.

MVZ. Juan Ramón Páez Garfias

DEDICATORIAS

A mis padres Maria Esther Garfias de Páez y Juan Ramón Páez Corral, por el cariño y apoyo que me han dado en los bueno y malos momentos de mi vida.

A mis hermanas, Mitzi, Mirza, Issa y a mis sobrinos, por todos los momentos felices que hemos pasado. A Ramón, por ser mi hermano y apoyarme en los momentos difíciles que se presentan durante este largo camino.

A mi abuela Eva Maria, a mi tía Leticia y a mi prima mariana, por los momentos felices que vivimos.

A mis tíos, Mari Carmen y Tomas, y a mis primos Tomy, Gabriela, Mari Carmen, Rocío y Ulises, por todo el apoyo que me dieron en cualquier momento que lo necesite.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Héctor Basurto y a su familia por brindarme su amistad, apoyo y por las bonitas experiencias que pasamos durante el trayecto de esta maestría.

Al Doctor Carlos Galina, por la disposición y horas de atención brindadas para la realización de este trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa Sánchez Torres y al Dr. German Mendoza Martínez, por las observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Doctor Jorge Avila García, por brindadarme su amistad y conocimientos de forma desinteresada.

Al CEIEGT y al personal académico que labora en él, gracias por las facilidades que me otorgaron para la realización de mi trabajo.

A mis amigos Cristina, Lissette, Ana, Luis, Felipe y Yuria, por haber tenido el gusto de conocerlos.

A Jimena y Karla, por el animo y apoyo brindado para continuar y lograr esta meta.

A los académicos y estudiantes que laboran en el Departamento de reproducción, Dr. Carlos Gutierrez, Dr. Joel Hernandez, Dra. Paramo, Arantza, Lucy, Gisel, Ana, Nicolas, Victor, Horacio, Ingrid, Ruiz, Salvador, Cipatti y Lucrecia, por su amistad incondicional y por los momentos que disfrutamos.

A mis amigos del laboratorio de endocrinología Gerardo, Clara y Susi.

INDICE	Página
Resumen	I
Abstract	III
Lista de cuadros y figuras	V
CAPITULO 1	
Introducción	1
CAPITULO 2	
Revisión de literatura	
2.1 Dinámica Folicular	4
2.2 Tratamientos de superovulación	6
2.3 Transferencia de embriones	10
2.4 Superovulación en vaquillas prepúberes	12
2.5 Factores que afectan la respuesta superovulatoria	13
2.6 Estadios de desarrollo del embrión	20
2.7 Criterios de evaluación de embriones	21
2.8 Clasificación de embriones con respecto a su calidad	23
CAPITULO 3	
Hipótesis y objetivos	24
CAPITULO 4	
Material y métodos	25
CAPITULO 5	
Resultados	31
CAPITULO 6	
Discusión	37
CAPITULO 7	
Conclusiones	46
CAPITULO 8	
Referencias	47

RESUMEN

MVZ. Juan Ramón Páez Garfias. **FACTIBILIDAD DE PRODUCIR EMBRIONES CON VAQUILLAS BRAHMAN (*Bos indicus*) EN CONDICIONES TROPICALES**

Con el objetivo de evaluar la respuesta superovulatoria de vaquillas Brahman (*Bos indicus*) a dos tratamientos en dos épocas, se sincronizaron 20 vaquillas de 18 a 24 meses en pastoreo. Se aplicó un CIDR-B durante 8 días sin importar el día del ciclo (día 0), 50 mg de progesterona, 2.5 mg de Benzoato de estradiol (IM) y se dividieron aleatoriamente en dos grupos. En época de secas (**ES**) el Grupo 1 (n=10) recibió un total de 270 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V) en aplicaciones decrecientes am-pm los días 6,7,8,9 y 300 UI de eCG (Folligon) el día 4. El grupo 2 (n=10) recibió 2000 UI de eCG el día 6. En ambos grupos el CIDR-B se retiró el día 8, se aplicó 25 mg de PGF2 alfa y se hizo ultrasonografía para determinar el número de folículos (**F**) ≥ 10 mm. Para la época de lluvias (**ELL**) se invirtieron los tratamientos de cada grupo. La detección de celo fue de manera continua, y se inseminó a las 12 y 24 h de detectado el estro y en las que no mostraron también fueron inseminadas. Se colectaron los embriones 7 días después por el método no quirúrgico. Los cuerpos lúteos (**CL**) y (**F**) ≥ 8 mm se observaron por ultrasonografía 5 días después de la colección. Los resultados se analizaron por estadística no paramétrica (Kruskall Wallis) y correlación de Spearman. El número de (**F**) ≥ 10 mm el día 8 fue mayor con el tratamiento FSH+eCG (22.4 ± 6.04) vs. eCG sola (14.1 ± 5.03) ($P < 0.06$). No hubo diferencias en **CL**, embriones totales (**ET**), congelados (**EC**), degenerados (**ED**) y folículos (**F**) ≥ 8 mm en función del tratamiento ($P > 0.06$). Los **CL**, **ET**, **EC** y **F** ≥ 8 mm fueron diferentes entre épocas ($P < 0.06$) (**ELL** 11.65 ± 9.88 vs. **ES** 5.25 ± 6.86), (**ELL** 2.2 ± 2.80 vs. **ES** 0.65 ± 1.31), (**ELL** 1.7 ± 2.43 vs. **ES** 0.15 ± 0.49) y (**ES** 4.2 ± 2.39 vs. **ELL** 2.5 ± 3.69) respectivamente. No hubo diferencia en el número de **F** ≥ 10 mm. Se concluye que la época del año influye sobre la respuesta superovulatoria de

vaquillas Brahman en trópico, independientemente de los tratamientos utilizados, siendo la época de lluvias en la que se obtuvo la mejor respuesta.

PALABRAS CLAVE: Epoca de secas, Epoca de lluvias, Folículos, Cuerpos Lúteos, Embriones Totales, Embriones congelados, Embriones Degenerados.

ABSTRACT

MVZ. Juan Ramón Páez Garfias. **FEASIBILITY OF EMBRYO PRODUCE WITH (*Bos indicus*) BRAHMAN HEIFERS IN TROPICAL CONDITIONS.**

With the objective to evaluate the superovulatory response of Brahman heifers, to two treatments in two different seasons, we synchronize 20 heifers 18-24 months old in shepherd, we applicate a CIDR-B from 8 day long, 50 mg progesterone and 2.5 mg estradiol benzoate (IM) with out to import the day of cycle what they were, then they were assigned at random in two groups. In the dry season (**ES**) group 1 (n=10) received 270 mg of NIH-FSH-P1 (Folltropin-V) decreasing dosages am-pm days 6,7,8,9 and 300 UI of eCG (Folligon) day 4, group 2 (n=10) received 2000 UI (Folligon) of eCG day 6, CIDR-B was removed day 8, 25 mg of Pgf2 were applicated and ultrasonic echography was done in both groups to determine the number of follicles (**F**) ≥ 10 mm. To the wet season (**ELL**) the treatments were inverted for each group. Estrous detection was made continuously and artificial insemination was made 12-24 h of estrous behaviors and the heifers that don't show it were inseminated too. The embryos were recovered 7 days after artificial insemination by none surgically way. Corpus luteum (**CL**) and **F** ≥ 8 mm were observed by ultrasonic echography 5 days after collection, results were analyzed by non parametric kruskall wallis and Spearman Rank correlation test. The number of **F** ≥ 10 mm at day 8 was grater with FSH+eCG (22.4 ± 6.04) vs eCG (14.1 ± 5.03) treatment ($p < 0.06$).

There was no difference in **CL**, Total embryos (**ET**), Freeze (**EC**) or Degenerated (**ED**) and **F** ≥ 8 mm with the treatment ($p > 0.06$). The **CL**, **ET**, **EC** and **F** ≥ 8 mm, were different between season ($p < 0.06$) (**ELL** 11.65 ± 9.88 vs. **ES** 5.25 ± 6.86), (**ELL** 2.2 ± 2.80 vs. **ES** 0.65 ± 1.31), (**ELL** 1.7 ± 2.43 vs. **ES** 0.15 ± 0.49) and (**ES** 4.2 ± 2.39 vs. **ELL** 2.5 ± 3.69), there was no difference in the number of **F** ≥ 10 mm. We conclude that the season of the year have an influence on the superovulatory response in the tropic Brahman heifers independent of used treatment, because of

this, the wet season is better to obtain a better response in an embryo transfer program.

Keywords: Dry season, Wet season, Follicles, Corpus luteum, Total embryo, Freeze embryo, Degenerated embryo.

Lista de cuadros

Figura 1 y 2. Protocolo de superovulación Folligon (eCG)	29
Cuadro 1 y 2. Respuesta al tratamiento de superovulación en época de secas y lluvias	33
Cuadro 3. Efecto de la época sobre el número de folículos ≥ 10 mm y cuerpos lúteos	34
Cuadro 4. Efecto del tratamiento sobre el número de folículos ≥ 10 mm y cuerpos lúteos	34
Cuadro 5. Efecto de la época sobre el número de embriones totales (ET) embriones degenerados (ED) y embriones congelados (EC)	35
Cuadro 6. Efecto del tratamiento sobre el número de embriones totales (ET) embriones degenerados (ED) y embriones congelados (EC)	35
Cuadro 7. Efecto de la época y tratamiento sobre el número de folículos ≥ 8 mm días después de la colección	36

CAPITULO 1

INTRODUCCION

La superficie tropical de México es cercana a los 50 millones de hectáreas, que representa la cuarta parte del territorio nacional; de esta región, el 37% se dedica a la explotación ganadera, principalmente bovinos, predominando las razas pertenecientes al género *Bos indicus* (Zeitoun *et al.*, 1996). Igualmente, en otros países, como Australia y Costa Rica, utilizan esta raza de bovinos debido a su rusticidad, excelente adaptación al estrés calórico, mayor tolerancia a las sequías y enfermedades; sin embargo, hay evidencias de que la productividad de la ganadería tropical es baja.

La ganadería tropical como ya se mencionó anteriormente se encuentra compuesta principalmente por bovinos de la raza cebú (*B. indicus*) y sus cruzas en diferentes proporciones con (*B. taurus*), por lo tanto este tipo de ganado es el que mejor se adapta a las adversidades del trópico y por eso es la raza de ganado predominante en estas zonas, sin embargo, su eficiencia productiva y reproductiva es menor que las razas pertenecientes al género *B. taurus* en condiciones climáticas diferentes (Frisch *et al.*, 1987; Villa Godoy, 1994)

En un análisis de la información publicada en México sobre los índices productivos en la ganadería tropical, Anta *et al.* (1989), encontraron que en las novillas la pubertad, el primer servicio y el primer parto ocurren en promedio a los 17, 24 y 35 meses de edad, respectivamente. Villa Godoy (1994), menciona que uno de los principales factores que limitan la duración de la vida productiva de las vacas es la edad tardía a la que tienen su primer parto, con un promedio de 4.1 años.

Para que las novillas reciban su primer servicio, se ha recomendado que tengan un 70% del peso corporal adulto que equivale a 350 kg aproximadamente. En condiciones de estabulación en climas templados, las vaquillas tanto lecheras como cárnicas (*B. taurus*), alcanzan el peso a la pubertad antes de los 12 meses de edad. No obstante, las vaquillas (*B. indicus*) y sus cruzas con (*B. taurus*) en condiciones de pastoreo tradicional en el trópico, se retrasa la edad a la pubertad

y a primer servicio por una baja ganancia diaria de peso, ya que las vaquillas de reemplazo se enfrentan a fluctuaciones muy marcadas en la disponibilidad y calidad de los forrajes a través del año.

El crecimiento de los pastos tropicales se afecta por diferentes factores, siendo decisiva la influencia de la época del año sobre la disponibilidad de forraje, por lo que ocurren periodos de extrema escasez durante el invierno y la sequía y periodos de abundancia durante la temporada de lluvias. Esta marcada variación en la alimentación, trae como resultado que la línea descriptiva de crecimiento en las vaquillas tenga una forma escalonada (Villa Godoy, 1995; Richard et al., 1989). Bajo esta perspectiva, el periodo improductivo de las novillas, representado por la fase de crecimiento y desarrollo, es muy amplio antes de entrar a la pubertad, tener su primer parto e incorporarse al hato productivo.

Estos periodos improductivos tanto de animales jóvenes como de adultos, junto con ciertas políticas han provocado que se importen grandes cantidades tanto de carne como de leche, al grado en que México es uno de los principales importadores de estos productos. Esto tiene que ver con un aumento en la demanda de productos alimenticios de origen animal debido a un incremento en el índice de crecimiento demográfico de nuestro país.

Esto ocurre a pesar de que no hace mucho tiempo se considero a las regiones tropicales de México como la alternativa más viable para solucionar el déficit e incrementar la producción de estos alimentos.

Ante la constante necesidad y demanda de nuestra creciente población por productos de origen animal, es necesario incrementar en la ganadería tropical el uso de técnicas de vanguardia que han demostrado ser eficaces para aprovechar el potencial reproductivo e incrementar la productividad de la ganadería bovina en zonas tropicales. Las técnicas de inseminación artificial (IA), conjuntamente con la producción y transferencia de embriones (TE) han adquirido tal importancia en las ultimas décadas al grado que en algunos países utilizan la IA en un 100% y la TE en menor proporción, como los procedimientos adecuados para gestar a sus animales. Estas técnicas representan un instrumento valioso de apoyo en el

mejoramiento genético y desarrollo animal, por lo que deben ser ampliamente utilizadas, a fin de incrementar los índices productivos y por lo tanto ser más eficientes para producir.

En México, y particularmente en la ganadería tropical, tanto la IA como la TE han tenido serias limitaciones; sin embargo, con su aplicación se podría obtener grandes beneficios ya que permiten el mejoramiento genético al optimizar el potencial reproductivo de los animales, incluso antes de su incorporación al manejo reproductivo convencional.

De tal manera, que por estos procedimientos podríamos intentar superovular y obtener embriones de vaquillas que todavía no estén en la línea de producción, en cualquier época y acortar este periodo improductivo para animales genéticamente superiores obteniendo algunas ventajas, como son:

- a) Tener un mayor número de crías por animal.
- b) Obtener descendencia antes de que el animal llegue al peso adecuado para incorporarse al hato productor.
- c) Evitar distocias y aprovechar en el menor tiempo posible el potencial genético de las vaquillas de alta calidad.
- d) Permitir un adecuado desarrollo de las hembras de raza (*B. indicus*) en las cuales se necesita hacer una evaluación fenotípica para obtener un registro de pureza.
- e) Poder estimar fenotípicamente su descendencia para determinar si hay problemas genéticos que puedan ser expresados de esta manera.
- f) Poder producir un mayor número de animales puros o F1, para producir pie de cría o animales cruzados y aprovechar el vigor híbrido para aumentar la productividad de los hatos en el trópico.

La superovulación (SO) y Transferencia de embriones (TE) ha sido ampliamente estudiada (Saumande y Chupin, 1986; Elsdén y Kessler, 1983; Guilbault *et al.*, 1991; Siddiqui *et al.*, 1999). Sin embargo, son pocos los trabajos en ganado *B. Indicus*, que demuestren si hay o no un efecto de época sobre la respuesta al tratamiento. En ganado *B. indicus* Bastidas y Randel, (1987) y Molina (2000)

trabajaron en vacas y han encontrado que el número de embriones transferibles sigue un patrón estacional. De aquí que el objetivo del presente trabajo fuese estudiar la factibilidad superovular y producir embriones en vaquillas cebú con dos tratamientos hormonales en dos épocas en el trópico húmedo, teniendo como meta la incorporación de las vaquillas jóvenes al proceso de producción antes de tener su primera preñez.

CAPITULO 2

REVISION DE LITERATURA

2.1 DINAMICA FOLICULAR

El desarrollo folicular ovárico en los bovinos es una secuencia de eventos organizados que han sido descritos como oleadas. La dinámica folicular es un proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos antrales durante el desarrollo de un folículo preovulatorio. Durante el desarrollo de cada oleada folicular (OF), los folículos atraviesan por diferentes etapas que se describen como:

Reclutamiento.- Es un proceso por el cual una cohorte de folículos comienza su crecimiento.

Selección.- Esta fase comienza cuando un folículo emerge de los folículos anteriormente reclutados y continúa su crecimiento; mientras que los demás folículos disminuyen su tamaño.

Dominancia.- Es cuando el folículo seleccionado ejerce un efecto negativo sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos (Ginther et al., 1989; Sirois et al., 1990).

Estas tres etapas, se llevan a cabo mediante el estímulo coordinado de hormonas gonadotropicas, esteroideas, factores de crecimiento y otros mecanismos de regulación, durante todas y cada una de las OF de un ciclo estral normal (Hodgen, 1982). El inicio de una OF en un ciclo estral, es el resultado del estímulo producido por la FSH (Adams et al., 1992a).



trabajaron en vacas y han encontrado que el número de embriones transferibles sigue un patrón estacional. De aquí que el objetivo del presente trabajo fuese estudiar la factibilidad superovular y producir embriones en vaquillas cebú con dos tratamientos hormonales en dos épocas en el trópico húmedo, teniendo como meta la incorporación de las vaquillas jóvenes al proceso de producción antes de tener su primera preñez.

CAPITULO 2

REVISION DE LITERATURA

2.1 DINAMICA FOLICULAR

El desarrollo folicular ovárico en los bovinos es una secuencia de eventos organizados que han sido descritos como oleadas. La dinámica folicular es un proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos antrales durante el desarrollo de un folículo preovulatorio. Durante el desarrollo de cada oleada folicular (OF), los folículos atraviesan por diferentes etapas que se describen como:

Reclutamiento.- Es un proceso por el cual una cohorte de folículos comienza su crecimiento.

Selección.- Esta fase comienza cuando un folículo emerge de los folículos anteriormente reclutados y continúa su crecimiento; mientras que los demás folículos disminuyen su tamaño.

Dominancia.- Es cuando el folículo seleccionado ejerce un efecto negativo sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos (Ginther et al., 1989; Sirois et al., 1990).

Estas tres etapas, se llevan a cabo mediante el estímulo coordinado de hormonas gonadotropicas, esteroideas, factores de crecimiento y otros mecanismos de regulación, durante todas y cada una de las OF de un ciclo estral normal (Hodgen, 1982). El inicio de una OF en un ciclo estral, es el resultado del estímulo producido por la FSH (Adams et al., 1992a).



Se ha determinado que los bovinos presentan un número distinto de OF a través del ciclo estral, y se han descrito de dos (Ginther et al., 1989) a tres (Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988; Pierson y Ginther, 1987) OF por ciclo.

En el ganado *B. Indicus* la mayoría experimenta tres OF durante un ciclo estral normal. Zeitoun, (1996) encontró en vacas Brahman, que el 53% de los animales presentaron tres OF, 38% tuvieron dos y solo el 9% presentaron cuatro. Rhodes, (1995) en vaquillas de la misma raza, obtuvo un 66.7% con tres OF, el 26.5% de dos y 6.8% de los animales tuvieron cuatro OF. Para un ciclo de dos oleadas, el reclutamiento de la primera oleada comienza el día de la ovulación (día 0), y alrededor del día 3 se presenta un folículo dominante que alcanza su máximo diámetro (folículo preovulatorio) al día 6, esta dominancia se mantiene hasta el día 10, para posteriormente sufrir la atresia. Alrededor de este día comienza la segunda OF, posteriormente el folículo seleccionado de esta segunda onda alcanzará la dominancia y llegará al tamaño adecuado para experimentar la ovulación cuando el CL comience su degeneración. Un ciclo de tres OF es caracterizado por una fase de dominancia folicular de menor duración para el folículo de la primera oleada que llega hasta esta etapa. Posteriormente el folículo de la segunda oleada dura menos tiempo y es de menor tamaño, la tercera OF es la que proporciona el folículo que experimentará la ovulación. Por lo tanto puede ser por esto que la duración de la fase lútea sea más larga en ciclos de cuatro que en ciclos de dos oleadas (Zeitoun et al., 1996).

Para efecto de los tratamientos de superovulación es de vital importancia conocer la dinámica folicular y los mecanismos que intervienen en ella, así se podrá saber cuando aplicar un tratamiento hormonal y de esta manera obtener los mayores beneficios mediante un adecuado crecimiento folicular.

2.2 TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACION

2.2.1 GONADOTROPINAS.

Las gonadotropinas son hormonas glicoprotéicas que se encuentran estructuradas por dos cadenas de aminoácidos denominadas α y β , ambas son necesarias para la actividad biológica. La función más importante de estas hormonas es la de ejercer un efecto estimulador sobre las gonadas: ovario y testículo, para producir el crecimiento folicular en hembras y la espermatogénesis en los machos. En hembras se utilizan algunas de estas hormonas para estimular el crecimiento folicular ovarico y posterior a la ovulación de estos llevar a cabo una fertilización en un proceso denominado superovulación. Dentro de las gonadotropinas más utilizadas para llevar a cabo una sobre estimulación en el ovario se utiliza la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG), Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH) junto con la Hormona Luteinizante (LH).

FSH y LH.- Estas dos hormonas glicoproteicas son utilizadas en combinación para la superovulación. Las preparaciones comerciales son extraídas y purificadas de la pituitaria de ovinos y porcinos al sacrificio (Armstrong, 1993); y por lo tanto tienen actividad de FSH y LH. Folltropin – V es una gonadotropina utilizada ampliamente para los tratamientos superovulatorios en vacas, la cual es extraída de la pituitaria de porcinos y que se le ha removido más del 80% de su contenido de LH.

eCG.- La gonadotropina coriónica equina es secretada por las copas endometriales de la yegua gestante y se obtiene del suero de yeguas gestantes entre los días 40 y 130 de la gestación (Dieleman et al., 1987).

hCG.- La gonadotropina menopáusica humana ó gonadotropina corionica humana es producida por las células binucleadas que se desprenden del corion fetal y se

entierran en el endometrio pasando a la circulación materna de la mujer durante la gestación

Durante los últimos años se han hecho enormes esfuerzos para mejorar la respuesta superovulatoria mediante el mejoramiento de las técnicas, así como de la aplicación de los diferentes tratamientos para mejorar la manipulación de las OF. El éxito de los protocolos de SO en vacas y vaquillas es influenciado por el número de folículos que son estimulados a crecer y que llegan a la etapa final, la ovulación. Actualmente hay una gran cantidad de tratamientos superovulatorios con diferentes preparaciones gonadotrópicas, todos encaminados al mejoramiento de la respuesta superovulatoria y por consiguiente la obtención de un mayor número de embriones por animal tratado. Las hormonas gonadotrópicas tales como la FSH, eCG, y HCG, son las mas utilizadas para llevar a cabo los tratamientos superovulatorios. En el mercado hay una gran cantidad de productos que son hechos con base en estos tres tipos de gonadotropinas siendo en mayor número los fabricados con FSH; (Follitropin-V, Pluset, Ovagen, Super-Ov, Pergovet) que con la eCG (Folligon) y HCG (Chorulon). Los trabajos de investigación con estas gonadotropinas están encaminados a encontrar el producto con el cual podamos obtener una mejor respuesta. Por lo tanto, se han llevado a cabo algunos trabajos de investigación utilizando tratamientos donde se utiliza únicamente una de estas hormonas (Huhtinen et al., 1992) y algunos otros donde se hacen comparaciones entre dos hormonas (Goulding et al., 1991).

El método de administración de un mismo tipo de hormona aunque con diferentes proporciones de LH en su estructura también ha sido objeto de investigación (Kelly et al., 1997), así como el uso de estos productos de diferentes formas, ya sea solos o combinados con otras hormonas como la bst (Cushman et al., 2001). Es bien sabido que la presencia de un folículo dominante afecta la respuesta superovulatoria tal como se mencionó anteriormente, por lo tanto se ha tratado de encontrar el día mas adecuado para llevar a cabo el tratamiento, con relación en los días del ciclo y el inicio de la OF y de esta manera evitar la presencia de un folículo dominante que nos afecte la respuesta (Goulding et al., 1990; Guilbault et



al., 1991). Algunos tratamientos se han apoyado en la utilización de hormonas esteroideas como estrógenos y progesterona antes de iniciar el tratamiento superovulatorio para evitar que un folículo dominante se encuentre presente cuando se inicie el tratamiento (Bo et al., 1998; Caccia et al., 1999). Esto debido a los reportes del efecto supresivo de la progesterona sobre el crecimiento folicular (Adams et al., 1992b) y el efecto del estradiol para inducir la atresia folicular, y permitir el reinicio de una OF 5.3 días después al utilizar benzoato de estradiol y 5 días al utilizar valerato de estradiol (Diershke et al., 1994; Bo et al., 1996).

La aplicación conjunta de hormonas esteroideas P_4 y E_2 ha sido utilizada en gran parte en tratamientos de sincronización, en donde se forma generalmente un folículo dominante persistente, cuya fertilidad es menor a un folículo con un período de crecimiento normal. Debido a ello, los tratamientos con esteroides inducen el recambio folicular (Atresia del FDP y el surgimiento de una nueva oleada Rajamahendran y Manikkam, 1994). Se piensa que el contenido de ácido siálico en la estructura de las gonadotropinas determina la vida media de las mismas. La eCG contiene una mayor cantidad de ácido siálico en su estructura en comparación con la FSH y LH lo que refleja su larga actividad biológica. La eCG debido a su larga vida media que varía entre 50 y 120 horas en la circulación (Dieleman et al., 1987). Esta ventaja biológica ha sido ampliamente utilizada en la SO, debido a su disponibilidad, su costo relativamente bajo y fácil administración. Así mismo solo se necesita una sola aplicación para llevar a cabo el efecto deseado sobre el ovario. La FSH por otro lado tiene una vida media de alrededor de 2 horas y requiere dos inyecciones por día por un periodo de 4 días, para mantener concentraciones circulantes adecuadas para producir el efecto superestimulador sobre el ovario (Boland et al., 1991). Sin embargo, algunos investigadores han realizado trabajos en donde se compara el tratamiento convencional de 4 aplicaciones cada 12 h de FSH o aplicando el total en una sola inyección, y esta última en diferentes sitios, detrás de la escápula o en la parte posterior de la nuca (Bo et al., 1994). Debido a la larga vida media de la eCG en la circulación, ésta induce de 3 a 6 folículos >10 mm pos ovulación y antes de la

colección embrionaria. Esto resulta en un ambiente uterino alto en estrógenos que tiene un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario (Saumande, 1980). En el caso de la FSH su corta vida media produce generalmente un menor número de folículos a la hora de la colección embrionaria, por esto el aplicar grandes cantidades de eCG tiene efectos contraproducentes sobre los picos de LH y por consiguiente, la ovulación. Saumande y Chupin, (1986) mencionan que la falla en la ovulación de los folículos puede ser debida a una des sensibilización de receptores de LH en el ovario por la actividad de la hormona, esto aunado a una disminución de los pulsos de LH en los tratamientos de SO (Gosselin et al., 2000) pueden ser junto con otros la causa de este trastorno.

En cada tratamiento superovulatorio hay folículos que fallan en alcanzar el proceso de ovulación y se ha argumentado que la falla de estos folículos a ovular puede ser debida a su tamaño y no a una causa intrínseca como se mencionó anteriormente, esto es que sean muy pequeños cuando el tratamiento con FSH sea aplicado y consecuentemente estos folículos no tienen la oportunidad de alcanzar la maduración dentro del tiempo de un protocolo convencional de superestimulación. D'Occhio et al., (1997, 1999) con base en esto propusieron que retardar el surgimiento de la LH daría la oportunidad para que los folículos alcanzaran la maduración resultando en un incremento en las ovulaciones y por lo tanto un mayor número de embriones viables. Debido a la gran variabilidad en las respuestas de los animales a los tratamientos, Braileanu et al., (1998) realizaron un trabajo para determinar si había variabilidad en la bioactividad e inmunoactividad de preparaciones comerciales de FSH. Al examinar estas preparaciones descubrieron que había variabilidad entre productos e inclusive entre las preparaciones comerciales de un mismo producto.

La industria de la TE va creciendo conforme avanza la Ciencia y la Tecnología. La variación que se presenta en estos tratamientos de SO ha causado que se hagan investigaciones sobre que está pasando a nivel endocrino en los tratamientos y plantear protocolos que nos ayuden a mejorar la respuesta. Simpson et al., (1994) trabajaron administrando insulina exógena a animales para ver sus efectos sobre

IGF-1, IGFBP, Estradiol y Progesterona folicular los cuales tienen un efecto directo sobre el crecimiento de los folículos en animales superovulados con FSH. Otros trabajos se han enfocado a determinar el efecto de la SO sobre proteínas reguladoras de la esteroidogénesis, sobre los receptores de lipoproteínas de baja densidad y ARNm de las enzimas P450_{scc} (Soumano y Price, 1997). Un año mas tarde se estudió el efecto de la SO sobre los niveles de RNAm que codifica para los receptores de las hormonas FSH y LH durante el tratamiento con eCG versus FSH (Soumano et al., 1998). Como podemos ver hay una gran variedad de tratamientos y todos encaminados a mejorar la respuesta y a la obtención de un mayor número de embriones, por lo tanto el encontrar el tratamiento mediante el cual se pueda obtener la mayor cantidad de embriones sigue ocupando gran parte de la investigación.

2.3 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La TE es una de las técnicas que se ha utilizado desde algunas décadas atrás siendo el primer reporte en 1951. Numerosos esfuerzos han sido encaminados a estudiar y mejorar las técnicas de colección y TE. La producción de embriones para su transferencia a hembras receptoras, puede ser realizada de dos maneras diferentes, *in vivo* o *in vitro*. La producción *in vivo* se lleva a cabo después de un tratamiento superovulatorio, el cual permite el crecimiento de folículos que experimentarán la ovulación, serán fertilizados y posteriormente colectados para congelarlos o transferirlos a receptoras. La producción de embriones *in vitro* se lleva a cabo mediante la aspiración de ovocitos de animales vivos por vía transvaginal guiada por ultrasonografía ó de animales muertos mediante la colección de ovocitos en ovarios de animales sacrificados para posteriormente poder realizar la fertilización en el laboratorio.

Anteriormente en la década de los 70_s, tanto la colección como la TE, se realizaban de manera quirúrgica por la parte media ventral del animal o por los flancos, siendo igualmente efectivas en los porcentajes de preñez. Sin embargo, el método de acercamiento por los flancos, ganó popularidad debido a que se

necesitaba menos equipo y a la facilidad (Shelton et al., 1980). La industria de la TE estaba ganando popularidad y se necesitaba investigar más sobre algunos temas involucrados en la técnica que eran de vital importancia, tales como: crio-preservadores, velocidad de congelación y descongelación, concentración de las diluciones y sobre las técnicas de TE, así como el desarrollo y la viabilidad de embriones congelados (Tervit y Elsdén, 1981). La técnica no quirúrgica para colectar y transferir embriones ya era utilizada por algunos investigadores en los 80s, aunque los porcentajes de preñez eran inconsistentes en los diferentes trabajos y se necesitaba perfeccionar la técnica antes de ser utilizada de manera rutinaria (Tervit et al., 1980). De esta manera algunos experimentos fueron llevados a cabo para mejorar la recuperación de estructuras en la técnica no quirúrgica (Rowe et al., 1980). Tervit et al., (1980) utilizaron el método no quirúrgico para transferir embriones congelados, obteniendo un 74.3% de preñez, además encontraron que el estadio de desarrollo embrionario antes de la congelación tenía una correlación con la calidad del mismo al descongelarlo. El gran número de vacas receptoras que tenían que ser operadas el mismo día, el estrés post operatorio y adhesiones en la cavidad abdominal eran dificultades que se presentaban en la técnica quirúrgica de transferencia embrionaria y que desalentaban a algunos investigadores. Esto provocó que se buscaran otros métodos de aplicación, Jillella et al., (1977) realizaron exitosamente la transferencia embrionaria mediante la canulación de la trompa de Falopio de una vaca Jersey, esto aunque de manera experimental daba otra opción a los investigadores.

Una de las limitantes para el uso generalizado de la técnica de TE, es tal vez su costo elevado. Madalena, (1993) reportó que el costo para producir un embrión en Estados Unidos es de 50 dólares aproximadamente, aunque los beneficios que se pueden obtener con esta técnica son las de incrementar la producción de animales genéticamente superiores, incrementar el número de progenie por donadora y por lo tanto, tener una mayor ganancia genética. Esto debido a un aumento en la intensidad de selección de hembras comparado con hatos que

utilizan la monta natural y donde la presión de selección es menor. Gandhi et al., (1998) encontraron que la ganancia genética por TE fue mayor que con los métodos convencionales en donde tuvieron mejores resultados en hatos moderadamente grandes (n= 200) que para hatos grandes (n= 400).

2.4 SUPEROVULACION EN VAQUILLAS PREPÚBERES

Los ovarios de vaquillas responden a los tratamientos de gonadotropinas mucho antes de la pubertad. Sin embargo Marion y Geir, (1971) sugieren que la respuesta ovárica a las gonadotropinas se incrementa con al edad, debido a que se puede inducir la ovulación en animales de 1 mes de nacidos aunque el número de ovulaciones inducidas es mayor en becerras de 5 meses de edad.

Diez años después Jillela y Baker, (1981) intentaron superovular becerras prepúberes mediante la administración de eCG e inducir la ovulación al administrar GnRH y obtener 3, 0 y 2 ovulaciones para cada becerro, y en los animales tratados con HCG se obtuvieron 5, 15 y 16 ovulaciones por animal.

Ya para estos años se utilizaban diferentes hormonas mediante las cuales se podía llevar a cabo un tratamiento de SO, así Longo et al., (1981) aplicaron una preparación de FSH-p a becerras de 2-6 meses de edad usando un número de aplicaciones y dosis diferentes, de esta manera concluyó que animales menores a 75 días responden de igual manera que animales de 75 a 165 días de edad. Boland et al., (1981) superovularon novillonas con eCG o extracto pituitario equino (HAP), con resultados parecidos a los obtenidos en becerras más jóvenes. Lo anteriormente mencionado nos demuestra que se puede llevar a cabo con éxito la estimulación folicular mediante la aplicación de hormonas exógenas en animales prepúberes. Esto sería de gran utilidad al poder aprovechar estas técnicas en animales de alto valor genético y económico, así de esta manera aumentar su productividad a una corta edad mediante la superovulación y obtención de embriones.

2.5 FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA

Se han identificado varios factores que tienen influencia sobre la respuesta superovulatoria. Estos incluyen factores propios del animal, factores relacionados con el estado fisiológico del animal y algunos otros como la nutrición, preparaciones hormonales y época del año entre otros. Estos factores podrían ser considerados como externos. Tales factores pueden influir de alguna manera en la respuesta a los tratamientos de SO

2.5.1 Edad.- En diferentes trabajos la respuesta superovulatoria con respecto a la edad ha tenido gran variabilidad en los resultados, de esta manera Lerner et al., (1986) mencionaron que el decremento en la respuesta superovulatoria podría ser debido a una reducción en el número de folículos capaces de responder al tratamiento gonadotrópico en vacas viejas. Hasler, (1992) consideró que la edad es un factor negativo determinante en la respuesta superovulatoria y en la fertilidad de vacas holstein. A pesar de que no hay muchos estudios sobre el efecto de la edad sobre la SO, los técnicos que actualmente realizan trabajos de superovulación recomiendan utilizar animales maduros, debido a que en animales viejos el número de ovulaciones en respuesta al tratamiento es menor.

2.5.2 Raza.- Algunos datos muestran que la raza por si misma es una fuente importante de variación en la producción de embriones. Los efectos de la raza sobre la respuesta superovulatoria, han sido demostrados también entre diferentes razas de ratones (Spearow, 1988). De esta manera, animales con una tendencia genética hacia un mayor número de ovulaciones tienen una mejor respuesta a los tratamientos de SO (Bindon et al., 1986). Existe evidencia de que hay diferencia entre raza con respecto al estímulo hormonal producido por las preparaciones de gonadotropinas sobre las células de la granulosa. Así, Kuran et al., (1996) encontraron que las células de la granulosa de vaquillas Hereford cruzadas, fueron más sensibles al estímulo con FSH o eCG en términos de producción de progesterona que vaquillas Charolais cruzadas.

2.5.3 Presencia de un folículo dominante.- Desde 1980 se sugirió que la presencia de un folículo dominante al comienzo del tratamiento superovulatorio era un factor determinante en la respuesta (Monniaux et al., 1983). El uso de la ultrasonografía transrectal en años anteriores (Qurik et al., 1986; Pierson y Ginther, 1984; Savio et al., 1988; Sirois y Fortune, 1988; Kastelic et al., 1990) para monitorear el desarrollo del folículo dominante, proporcionó una excelente información para describir el efecto del día del ciclo estral al comienzo del tratamiento y su influencia sobre la respuesta superovulatoria. A partir de esos hallazgos se ha tratado de evitar la presencia de un folículo dominante al iniciar los tratamientos superovulatorios por diferentes maneras, ya sea, aplicando el tratamiento cuando comienza el reclutamiento folicular, provocando la ovulación o atresia del folículo por administración de hormonas de manera exógena, punción o cauterización. Así Kohram et al., (1995) reportaron un aumento en la respuesta superovulatoria después de inducir la ovulación del folículo dominante con GnRH, sin embargo, este tratamiento redujo el número de embriones viables. Goulding et al., (1990) superovularon vaquillas con FSH al día 2 o al día 10 del ciclo estral, y obtuvieron mejor respuesta en las superovuladas al día 10. Guilbault et al., (1992) trabajaron con vacas con y sin un folículo dominante entre el día 9 y 12 del ciclo, y obtuvieron un mayor número de embriones recuperados en las vacas que no tenían un folículo dominante al inicio del tratamiento. Por lo que en la mayoría de los trabajos se SO han utilizado hormonas (E_2 y P_4) así como una pre sincronización para poder iniciar el tratamiento el día 10 del ciclo y poder descartar la presencia de un folículo dominante y obtener buenos resultados (Bo et al., 1998; Siddiqui et al., 1999; Gosselin et al., 2000).

2.5.4 Época del año.- En los estudios encaminados a determinar el efecto de la época del año sobre la respuesta superovulatoria en vacas, se han obtenido diferentes resultados. Las vacas son animales policíclicos regulares y no tienen una época reproductiva definida; sin embargo, la eficiencia reproductiva varía a través del año (Mezzadra et al., 1993). Algunos trabajos se han encaminado a

determinar el efecto de la época sobre la calidad de ciertas estructuras. Por ejemplo, en un estudio donde aspiraron ovocitos en dos épocas del año Rocha et al., (1998) encontraron menor número de estos clasificados morfológicamente como normales y su fertilización *in vitro* fue menor en los obtenidos en verano comparados con los obtenidos en invierno. De esta manera podemos decir que la época afecta la morfología del ovocito y de igual manera se esperaría un efecto similar en la calidad de los embriones. Siddiqui et al., (1999) en vacas Holstein en clima tropical, obtuvieron mayor número de embriones viables en invierno, seguido por verano. Probablemente los bovinos no sean estacionales, aunque Stahringer et al., (1990) encontraron que la incidencia de anestro en vaquillas Brahman fue mayor en meses con fotoperíodos cortos. Harrison et al., (1982) reportaron que vacas Brahman tuvieron mayores concentraciones de LH y progesterona durante la primavera que durante el invierno. Badinga et al., (1994) encontraron efecto de temporada en cuanto la velocidad de crecimiento del folículo preovulatorio, tamaño del mismo, concentraciones de progesterona y tamaño del CL, relacionado con el tamaño del folículo dominante del ciclo, esto indica que la época afecta de alguna manera el crecimiento y desarrollo de los folículos, lo que repercute posteriormente en el número de CL. Zeron et al., (2001) demostraron que en vacas y vaquillas Holstein, el número de folículos de 3-8 mm fue mayor en invierno comparado con verano, y que en invierno el porcentaje de vacas que tuvieron menos de 10 folículos por ovario fue de 16% y en verano 50%, esto quiere decir que en animales Holstein hay un mayor número de folículos que inician su crecimiento en los meses fríos. Así mismo, Molina, (2000) encontró en vacas Brahman una mejor respuesta al tratamiento de SO en el grupo no tratado con bst en época de lluvias. Todo lo anterior sugiere que la época del año juega un papel importante en la respuesta de los animales a los tratamientos.

2.5.5 Ambiente.- La habilidad de los animales de remover eficientemente el calor metabólico, es extremadamente importante para el mantenimiento de una temperatura corporal constante y no entrar a un estrés calórico (EC). Durante el

día el aumento de temperatura por la radiación solar y metabolismo usualmente excede la capacidad de pérdida de calor de los animales por mecanismos de radiación, convección y evaporación, en consecuencia el calor se almacena y la temperatura corporal aumenta. Wolfenson et al., (1995) indicaron que el EC puede alterar el desarrollo y la dominancia folicular en vacas Holstein ciclando.

Los mecanismos por los cuales el EC reduce la expresión del estro son tal vez debido a una reducción en las concentraciones circulantes de 17β -Estradiol, causado por el aumento de las concentraciones de Adrenocorticotropina, la cual ejerce un efecto negativo sobre la liberación de Estrógenos, y éstos a su vez tienen un efecto directo sobre la conducta estral (Hansen y Arechiga, 1999). Lew et al., (1993) reportaron que el EC alteró la cascada de esteroidogénesis en las células de la teca del folículo dominante. Badinga et al., (1993) observaron que el primer folículo ovulatorio del posparto en vacas expuestas a EC fue menor en tamaño y el CL produjo menos progesterona comparado con el de vacas normales. El EC sobre la esteroidogénesis, sin duda tiene un efecto directo sobre la dinámica folicular de las vacas, tal como lo mencionan Wolfenson et al., (1995) quienes encontraron un efecto del EC sobre el folículo dominante de la primera OF del ciclo, causando un incremento en el número de folículos > 10 mm en diámetro y un temprano surgimiento del folículo dominante de la segunda OF. Wilson et al., (1998) sometieron a EC vaquillas Holstein en el día 11 del ciclo estral y observaron un efecto negativo sobre el tamaño del folículo dominante de la segunda OF.

Los mecanismos por los cuales el EC reduce el desarrollo embrionario parecen ser multifactoriales, no obstante la exposición de embriones a las temperaturas normales del recto en vacas lactando en Florida durante el verano, pueden afectar el desarrollo embrionario (Rivera y Hansen, 2000 citado por Hansen et al., 2001). Sin embargo, el embrión también puede desarrollarse en animales expuestos a EC. Una de las características del desarrollo embrionario es que el embrión se vuelve más resistente al EC materno conforme avanza la preñez, por ello, la mórula es menos susceptible al daño y a interrumpir su desarrollo que un embrión

de dos células, ambos expuestos a elevadas temperaturas (Ealy et al., 1995; Edwards y Hansen, 1997). Aunque el crecimiento del embrión le confiere cierta resistencia, la exposición a altas temperaturas entre los días 8-16 de la preñez, reduce el tamaño embrionario al día 17 de desarrollo (Biggers et al., 1999).

Hay claras diferencias entre razas en cuanto a la resistencia al EC (Finch, 1986; Hammond et al., 1996, 1998). La capacidad para disipar el calor y de esta manera mantener una temperatura corporal adecuada varía entre razas. Hammond et al., (1998) encontraron diferencias en la temperatura rectal de diferentes razas en condiciones tropicales, donde la raza Angus tuvo la mayor elevación de temperatura comparado con Brahman y sus cruza. Recientemente, fue demostrado que la disminución en el crecimiento embrionario causado por el cultivo y exposición de estos a 41° C por 6 h fue menor para embriones de vacas Brahman que para embriones de vacas Holstein o Angus (Paula-López et al., 2001). Algunos investigadores han puesto cierto interés en encontrar métodos farmacológicos para regular la temperatura corporal durante el EC, por ejemplo hay reportes en donde la alimentación con extractos de cultivo de hongos (*Aspergillus oryzae* Huber et al., 1994) y el suplemento con niacina (Spain y Spiers, 1997) pueden disminuir la temperatura corporal en animales expuestos a EC.

2.5.6 Nutrición.- Los efectos adversos de una defectuosa alimentación sobre el desarrollo reproductivo del ganado pueden ser debido a disturbios hormonales a nivel del ovario, pituitaria anterior y/o hipotálamo (Schillo, 1992). Henricks et al., (1986) encontraron que la desnutrición en vaquillas de carne en el posparto resultó en un decremento en la concentración de estradiol y retardo en el crecimiento folicular. Actualmente la teoría del lipostato propone que en ciertas especies se requiere de cierta cantidad de tejido adiposo para el inicio y mantenimiento de la actividad reproductiva (Jolly et al., 1995). Murphy et al., (1991) demostraron que un bajo consumo de energía en la dieta redujo el diámetro máximo del folículo dominante y acortó la persistencia del mismo en el

ovario. Nolan et al., (1998) encontraron evidencia que el consumo de la dieta de vacas superovuladas puede influenciar el desarrollo de embriones; el consumo desmedido de alimento, la falta de consumo como en la composición del mismo, pueden afectar la respuesta de los animales a los tratamientos de SO. El consumo de concentrado *ad libitum* tuvo un efecto adverso en el número de embriones recuperados y congelables, en comparación con animales que consumieron solo 3 kg de concentrado, al mismo tiempo animales que consumieron concentrado elaborado con pulpa de cítrico, respondieron mejor que las vaquillas que solamente se les ofreció avena (Yaakub et al., 1999). Humblot et al., (1998) encontraron que altos niveles de energía afectan la respuesta ovárica y la calidad de embriones.

Saumande et al., (1998) recomendaron para la producción de embriones viables con vaquillas, un plan de nutrición con ganancias de peso vivo de 1 kg como óptimo. En la Universidad de Kentucky, Gong et al., (1999) encontraron que un incremento en un 200% de los requerimientos de mantenimiento en el consumo de la dieta por tres semanas antes de la SO, aumentó el reclutamiento de folículos en vaquillas Hereford x Holstein y tuvieron más CL que en el grupo control (18.1 y 10.6). Por lo que someter a los animales a un buen programa de alimentación previo al tratamiento de SO es muy importante para que se pueda tener éxito en la respuesta, ya que como se mencionó anteriormente tanto los excesos como la falta de los nutrimentos adecuados, puede ocasionar una mala respuesta.

2.5.7 Infecciones subclínicas. - Las infecciones uterinas también tienen un efecto negativo sobre la viabilidad del embrión. La deficiencia de minerales ocasiona una colonización en el endometrio de ciertas especies de bacterias tales como: *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus haemolyticus* y *Bacillus spp* las cuales causan problemas de fertilidad (Dutta et al., 1991). El papel de estos agentes en las infecciones uterinas y en la alteración de la función ovárica ya había sido demostrado previamente en ganado de leche (Bosu y Peter, 1987). Peter et al., (1989) hicieron infusiones intrauterinas de endotoxina de *E. coli*

en el periodo preovulatorio, lo cual resultó en un incremento en las concentraciones de cortisol plasmático, y provocó una supresión de la LH con una *subsecuente falla en la ovulación y la formación de un folículo quístico*. Las infecciones intrauterinas con *Leptospira spp.* también influyen en la viabilidad y desarrollo de los embriones (Bielanski et al., 1998).

2.5.8 Lactancia.- La diferencia entre la energía de consumo y los requerimientos energéticos para la producción de leche resultan en un balance energético negativo días posteriores al parto. Lucy et al., (1991) encontraron que vacas lactando en un balance energético negativo tuvieron pocos folículos con un diámetro > 10 mm durante el posparto temprano. Esta condición metabólica es similar a la desnutrición, debido a que se necesitan grandes cantidades de energía para producir leche, más de la que se consume. Por lo tanto Britt, (1992) ha especulado que la calidad de los folículos destinados a ovular puede depender del nivel nutricional y el ambiente bajo los cuales se desarrollaron estos folículos muchas semanas antes de la ovulación, ya que los folículos ováricos comienzan su crecimiento 40–60 días antes de que alcancen su tamaño maduro y ovulen.

2.5.9 Variación causada por impurezas de las preparaciones gonadotrópicas.- La cantidad de la hormona luteinizante (LH) junto con la folículo estimulante (FSH) en las preparaciones gonadotrópicas usadas afecta en gran manera la respuesta a los tratamientos, esto debido a que las preparaciones gonadotrópicas con un alto contenido de LH generalmente resulta en una baja respuesta superovulatoria (González et al., 1990). Por lo tanto si las preparaciones de FSH y eCG contienen grandes cantidades de LH, puede ocurrir una ovulación o luteinización prematura de los folículos (Callesen et al., 1986). Braileanu et al., (1998) compararon la bio actividad en preparaciones comerciales de gonadotropinas y concluyeron que hay diferencias en cuanto a la inmunoreactividad y bioactividad entre y dentro de las preparaciones comerciales de FSH.

2.6 ESTADIOS DE DESARROLLO DEL EMBRIÓN

2.6.1 Mórula temprana.- Se refiere a una agrupación o masa de células que tienden a ser esféricas, en la cual se pueden observar individualmente los blastómeros, la cuenta celular es difícil. La masa celular ocupa el 80% del espacio perivitelino.

2.6.2 Mórula madura.- La principal característica de este estadio es la compactación de la masa celular y con blastómeros de forma poligonal. En la periferia de la masa celular las células son esféricas. La observación individual de los blastómeros es imposible, la masa celular ocupa el 60% ó el 70% del espacio perivitelino.

2.6.3 Blastocisto temprano.- Es un embrión en fase de mórula compacta en la que se empieza a formar una cavidad interna ocupada por fluido conocido como blastocele. El blastocisto tiene una apariencia de anillo y ocupa del 70% al 80% del espacio perivitelino. La diferencia visual entre el trofoblasto y la masa celular es apreciable. El blastocele abarca menos del 50% de la masa celular del embrión.

2.6.4 Blastocisto maduro.- Se caracteriza por una pronunciada diferenciación entre las células del trofoblasto que se alarga y extiende en toda la periferia del embrión y el disco embrionario que es una masa muy pequeña de color muy oscuro y más compacto. El blastocele abarca más del 50% de la totalidad del embrión y el embrión ocupa el 90% del espacio perivitelino.

2.6.5 Blastocisto expandido.- La principal característica de este estadio es el aumento considerable del diámetro del embrión, así como el adelgazamiento de la zona pelúcida hasta un tercio de su grosor normal y la ocupación del 100% del embrión en el espacio perivitelino. En algunos casos se pueden coleccionar

blastocistos expandidos que se colapsan con pérdida total o parcial del blastocele; sin embargo, su zona pelúcida queda sin modificarse.

2.6.6 Blastocisto en eclosión.- En esta fase de desarrollo, el embrión tiene fisurada la zona pelúcida por donde eclosiona paulatinamente hasta salir totalmente de ella. El embrión puede tener la forma esférica de un blastocisto expandido o bien estar colapsado (Noriega et al., 1995).

2.7 CRITERIOS PARA LA EVALUACION DE EMBRIONES

2.7.1 Estado de desarrollo de acuerdo a la edad.- Los embriones colectados deben tener un estadio de desarrollo relacionado con el día en que se realice la colección embrionaria, es decir, si se colecta en el 7º día, habrá mórulas compactas, blastocistos jóvenes y blastocistos maduros. Cualquier embrión que se encuentre en un estadio de desarrollo más joven será un embrión retrasado de 1 a 1.5 días y esto disminuye los porcentajes de gestación. También se pueden colectar embriones con una edad de 7.5 a 8 días, corriendo el riesgo de encontrar embriones eclosionados, pues al momento de congelarse bajan los porcentajes de viabilidad por la pérdida de la zona pelúcida.

2.7.2 Número de células (blastómeros).- Es muy importante la cuenta de los blastómeros; cuando un embrión tiene menos de 30 células, al colectarse en el 7º día es un embrión no transferible, sólo cuando el número de blastómeros sea difícil de contar (sin tomar en cuenta otras características morfológicas) será un embrión apto para la transferencia.

2.7.3 Compactación de células.- Cuando los blastómeros del embrión están compactos y presentan una forma poligonal es porque se encuentran apretados entre ellos, dando al embrión una apariencia de mora. Los blastómeros que se encuentran en la periferia de la masa celular tienen una forma redondeada pues no se ejerce ninguna presión sobre ellos, a diferencia de los embriones no

compactados en los que se observa gran parte de cada blastómero que indicando la separación entre ellos. Una buena compactación permite la nutrición entre los blastómeros y contribuye a la formación de la cavidad del blastocele. Los blastómeros tienen una forma poligonal, cuando están bien compactados y presentan un tamaño muy uniforme y simétrico.

2.7.4 Color.- Los embriones con una excelente calidad deben tener un color ámbar característico. Los embriones con una calidad buena presentan un color más oscuro pero uniforme. La presencia de manchas claras y oscuras o cuando el embrión es muy claro indican la existencia de vesículas, que se asocian con problemas metabólicos. La presencia de vesículas es normal siempre y cuando no sean muy grandes y se localicen en embriones de estadios como blastocistos tempranos y blastocistos maduros.

2.7.5 Blastómeros extruidos.- Los blastómeros extruidos son células que se quedaron en una etapa temprana de desarrollo y se observan como células grandes fuera de lo que es la masa celular del embrión, entre la masa y la zona pelúcida (espacio perivitelino), mientras más blastómeros extruidos tenga un embrión menor será su calidad.

2.7.6 Irregularidades en la zona pelúcida.- Esto no causa ningún problema siempre y cuando esta irregularidad no sea la ruptura de la zona pelúcida, ya que un embrión que tiene la zona pelúcida rota no es aconsejable congelarlo, debido a que sufren daño las células del embrión. Esta condición en el embrión no le dará una menor calificación; sin embargo, la primera opción para este tipo de embriones sería transferirlos en fresco.

2.7.7 Presencia de restos celulares en el espacio perivitelino.- La presencia de restos celulares nos indica el rompimiento de membranas o la degeneración de las

células, dependiendo de la cantidad de este material, será el grado de degeneración del embrión (Noriega et al., 1995).

2.8 CLASIFICACION DE EMBRIONES CON RESPECTO A SU CALIDAD

2.8.1 Excelente o calidad 1.- Es un embrión compacto, esférico, desarrollo adecuado a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares, sin blastómeros extruidos y color ámbar uniforme

2.8.2 Bueno o calidad 2.- Embrión compactado o con leve descompactación, poco irregular, desarrollo adecuado a su edad, presencia de vesículas pero no abundantes, con algunos blastómeros extruidos, con pocos desechos celulares, color uniforme, tal vez un poco oscuro o zonas claras y oscuras, pero no muy marcadas.

2.8.3 Regular o calidad 3.- Descompactación marcada, desechos celulares, blastómeros extruidos, color obscuro o con zonas claras y oscuras (presencia de vesículas), masa pequeña pero no menor al 50% de lo normal. Estos embriones de preferencia se transferirán en fresco, ya que no soportan satisfactoriamente la congelación.

2.8.4 No transferibles o calidad 4.- Son los embriones no transferibles con marcada degeneración, masa pequeña menor al 50% de lo normal, descompactación, retraso en el desarrollo (mas de dos días), color oscuro, zonas claras y oscuras e irregularidades en los blastómeros (Noriega et al., 1995).

CAPITULO 3

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Las vaquillas responderán a los tratamientos de superovulación y el número de embriones transferibles será igual para cada época.

OBJETIVOS

- Determinar con cual tratamiento superovulatorio se obtienen mayor número de embriones transferibles.
- Determinar el número de embriones que se pueden obtener por donadora en las dos épocas.
- Establecer la calidad de los embriones en las dos épocas de tratamiento.

CAPITULO 4

MATERIAL Y METODOS

LOCALIZACION

El trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (C.E.I.E.G.T.) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.). Este centro está ubicado en el municipio de Tlapacoyan, estado de Veracruz. Posee una temperatura media de 21.8° C con un máximo de 40° C y un mínimo de 13° C. Cuenta con un régimen pluvial de 1780 mm anuales. El clima de la región está clasificado como caliente, húmedo sin temporada seca definida (García et al., 1981). Sin embargo, en la región las condiciones climáticas dividen el año en tres épocas: La época de nortes que se caracteriza por baja temperatura ambiental y elevada humedad relativa (Noviembre – Febrero), la época de secas, se diferencia por alta temperatura ambiente y baja precipitación pluvial (Marzo – Junio) y la época de lluvias que esta caracterizada por alta temperatura ambiente y elevada precipitación pluvial (Julio – Octubre) (Basurto, 1992)

UNIDADES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 20 vaquillas cebú con edades entre 18 y 24 meses, las cuales fueron seleccionadas en función de las siguientes características: a) Libres de brucelosis y tuberculosis, b) carecer de anormalidades anatómicas y fisiológicas del aparato reproductor a la palpación rectal y ultrasonografía. Posteriormente los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de 10 animales cada uno.

ALIMENTACION Y COMPLEMENTACION ALIMENTICIA

Todas las vaquillas, desde el inicio del trabajo fueron mantenidas en pastoreo en praderas de Estrella de África (*Cynodon plectostachyus*) y gramas nativas (*Axonopus spp* y *Paspalum spp*); manteniendo una carga animal promedio

de 1.5 UA/ha, para asegurar una disponibilidad de 20 kg de materia seca (MS) por animal por día. Adicionalmente, durante 45 días previos los animales recibieron diariamente un complemento alimenticio de concentrado comercial con 14 % PC y un mínimo de 1.4 Mcal de energía digestible por kg de MS a razón de 1% de peso corporal por día según lo recomendado como óptimo (Saumande et al., 1998) en las dos etapas del trabajo, secas y lluvias.

TRATAMIENTO HORMONAL

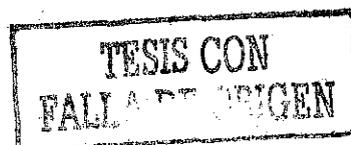
Sincronización.

El trabajo se llevó a cabo en dos épocas del año: Época de secas (Marzo – Junio) y lluvias (Julio – Octubre).

En las dos épocas se realizó una ultrasonografía a los animales antes de la sincronización para determinar su estado reproductivo. La sincronización se llevó a cabo sin importar el día del ciclo en el que se encontraban y se realizó con un día de diferencia entre grupos para no tener dificultades a la hora de la colección embrionaria. El tratamiento de sincronización consistió en la aplicación de un dispositivo de liberación controlada de progesterona (CIDR - B) el cual contiene 1.9 g de progesterona natural impregnada en un dispositivo de silicona inerte, además se aplicó 2.5 mg de Benzoato de Estradiol IM y 50 mg de progesterona líquida (Syntex), este día se tomó como día cero (d 0), posteriormente las vaquillas fueron distribuidas en 2 grupos de manera aleatoria para realizar los tratamientos correspondientes.

Tratamientos de superovulación.

Grupo 1 (n=10). Las vaquillas recibieron 2000 UI de gonadotropina corionica equina (eCG) (Folligon - Intervet, México) el día 6 después de la aplicación del CIDR – B y se les administró anticuerpos monoclonales (ANTI-eCG) el día de la primera inseminación (Mapletoft et al., 1990) para contrarrestar los efectos negativos de la eCG.



El grupo 2 (n=10). Recibieron un tratamiento con 270 mg de FSH (Folltropin - V Litton, México) divididos en 8 aplicaciones en dosis decrecientes con 12 hrs de diferencia (AM – PM) los días 6,7,8 y 9 a partir de la aplicación del CIDR - B. Además, se les aplicó 300 UI de eCG (Folligon - Intervet, México) dos días antes del inicio del tratamiento de SO (Caccia et al., 1999).

El retiro del CIDR - B se realizó al día 8 de la aplicación junto con la aplicación de 25 mg de Prostaglandina F_{2α} (Lutalyse - Upjohn, México) para los dos grupos. Ese mismo día se hizo un examen ultrasonografico (Aloka 500 con transductor lineal de 7.5 Mhz) para determinar el número de folículos ≥10 mm. La detección de celos se llevó a cabo después de la aplicación de la PGF_{2α} mediante una observación continua durante las siguientes 72 h. La IA se realizó con semen congelado a las 12 y 24 h de haberse detectado los animales en celo. Las novillas que no presentaron conducta estral se les realizó un examen ginecológico para determinar turgencia del útero, presencia de moco cervico-vaginal y también fueron inseminadas.

En la época de lluvias se invirtieron los grupos en función al tratamiento, de manera que; el grupo que recibió el tratamiento con eCG en la época de secas, recibió el de FSH en época de lluvias.

INSEMINACION Y COLECCION DE EMBRIONES

En las dos épocas la colección embrionaria se realizó 7 días después de la primera IA, mediante la técnica no quirúrgica recomendada por Halley et al., (1979). En cada novillona se utilizó un dilatador para poder ampliar el canal del cérvix y posteriormente se utilizó para cada novillona un catéter del número 14 confirmando su colocación mediante la palpación del globo en útero, posteriormente se conectó al catéter una sonda de dos vías junto con un recipiente que contenía un litro de agua tridestilada, adicionado con Suero Bovino Buforado Fosfatado (D-PBS Dulbeco) y Albúmina Bovina; el lavado se realizó de manera bi cornual y el líquido colectado se pasó a través de un filtro concentrador de embriones, con poros de 80 micras de diámetro (De la Torre et al., 1992).

Posteriormente los embriones fueron llevados al laboratorio para ser evaluados al microscopio estereoscópico y congelar los embriones clasificados como viables. Cinco días después de la colección embrionaria se hizo una evaluación ultrasonográfica debido a que las condiciones climáticas no lo permitieron hacer el día de la colección, para determinar las estructuras lúteas y foliculares presentes, además de la aplicación de 25 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Los embriones fueron clasificados según el grado de desarrollo con respecto al día del lavado de las novillas en: Óvulos, no fecundados, Mórula inmadura, Mórula joven, Mórula compacta, Blastocisto inmaduro, Blastocisto maduro, Blastocisto expandido, Blastocisto en eclosión, siguiendo las descripciones hechas por (Lidner y Wright, 1983).

Según su calidad se clasificaron como: Excelente, bueno, regular y malo.

Los embriones clasificados como Excelentes y buenos (Transferibles) se congelaron por el método de un solo paso descrito por Leibo et al., (1984).

VARIABLES DEPENDIENTES

- Número de cuerpos lúteos.
- Número de folículos ≥ 10 mm.
- Número de embriones (Excelentes, Buenos, Regulares, Malos).

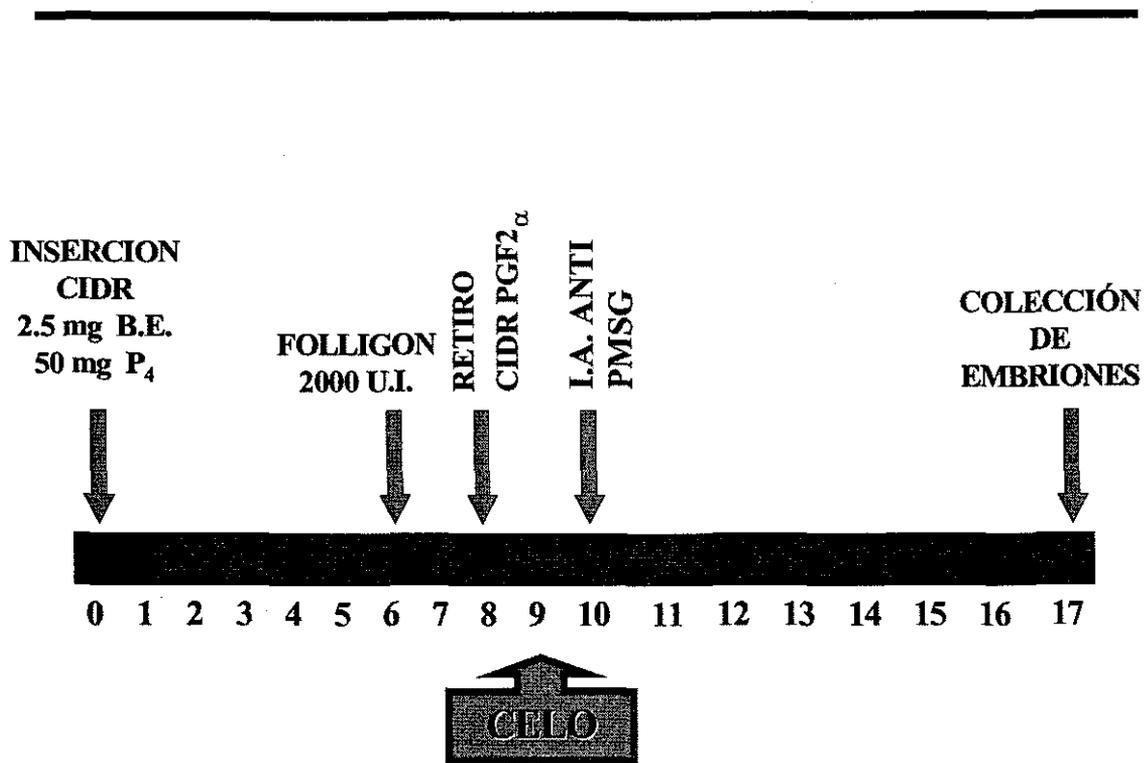
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis (Estadística no paramétrica) y correlación de Spearman, usando el paquete estadístico PRIMER. Las variables independientes fueron época del año y tratamiento, y como variable de respuesta el número de folículos, número de CL's y número de embriones totales, congelables y degenerados.

TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACION

PROTOCOLO DE SUPEROVULACION FOLLIGON (PMSG)

Figura 1

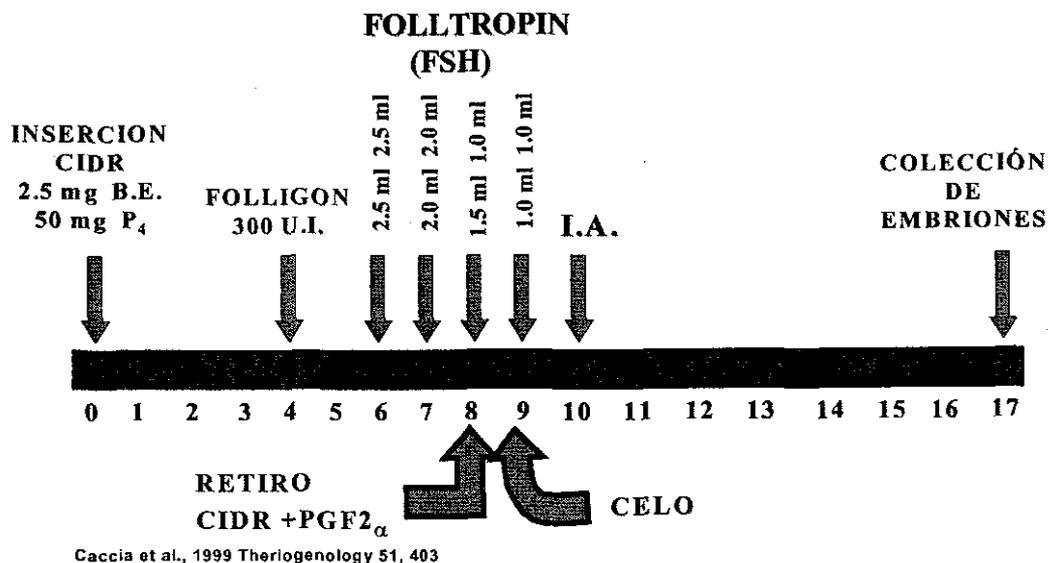


- | | |
|-------------------------------|-------------------------|
| CIDR-B | (InterAg - New Zealand) |
| Progesterona - P ₄ | (Syntex - México) |
| CIDIROL - BE. | (Latinagro - México) |
| eCG | (Intervet - México) |
| Lutalyse | (Upjhon - México) |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROTOCOLO DE SUPEROVULACION FOLLTROPIN (FSH)

Figura 2



- CIDR (InterAg - New Zealand)
- Progesterona - P4 (Syntex - México)
- CIDIROL - BE. (Latinagro - México)
- Folltropin - V (Litton - México)
- eCG (Intervet - México)
- Lutalyse (Upjhon - México)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 5

RESULTADOS

Después de hacer el análisis estadístico, no hubo diferencia significativa en el número de animales que presentaron celo en las diferentes épocas ($p > 0.06$) ya que en época de secas 14/20 animales mostraron celo y en época de lluvias 18/20. El tratamiento no tuvo efecto sobre el número de animales que presentaron celo.

Como se muestra en los cuadros 1 y 2 solo dos animales del grupo 1 produjeron embriones en respuesta al tratamiento de SO en las dos épocas, los demás solo produjeron en época de lluvias. De igual manera en el grupo 2, solo dos animales produjeron embriones en ambas épocas, los demás solo respondieron en época de lluvias. Esto nos muestra la variabilidad de respuesta que hay en los animales a los tratamientos de SO. Cabe hacer notar que no se tuvo dificultad en introducir y colocar el catéter en ninguna de las dos épocas, para realizar los lavados uterinos de las novillonas.

No existió diferencia significativa ($p > 0.06$) al comparar el número de folículos que llegaron hasta un diámetro de 10 mm o más entre las dos épocas al llevarse a cabo el tratamiento superovulatorio (Cuadro 3). En contraparte los resultados nos muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.06$) en el número de folículos que respondieron a los tratamientos que se aplicaron, por lo que tuvimos un mayor crecimiento folicular a favor del tratamiento donde se utilizó FSH en combinación con una dosis baja de eCG en comparación a los animales tratados con eCG sola (Cuadro 4).

De igual forma se analizaron los datos para determinar el efecto de época sobre la respuesta al tratamiento superovulatorio para la variable número de CL. Los resultados indican que de igual manera, el número de estructuras lúteas fue afectado por la época del año, al haber una diferencia estadísticamente

significativa ($p < 0.06$) favorable para la época de lluvias (Cuadro 3). El tratamiento no mostró diferencia significativa ($p > 0.06$) sobre la misma variable (Cuadro 4).

Al evaluar el efecto del tratamiento de SO sobre el número de embriones totales, embriones degenerados y embriones congelables obtuvimos un efecto de época en cuanto al número de embriones totales y congelados ($p < 0.06$) mas no hubo efecto de época en cuanto a número de embriones degenerados ($p > 0.06$) (Cuadro 5). Al realizar el análisis para las mismas variables embriones totales, degenerados y congelados entre tratamientos, no obtuvimos diferencia significativa ($p > 0.06$) para las mismas (Cuadro 6).

Los resultados obtenidos al analizar los datos indican que hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.06$) y un menor número de folículos después de la colección en época de secas vs lluvias (Cuadro 7)

Al analizar los datos para determinar si el tratamiento tenía alguna influencia sobre el número de folículos 5 días después de la colección, no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.06$) (Cuadro 7).

Al hacer la correlación para el número de cuerpos lúteos y el número de embriones totales, no obtuvimos una relación entre estas variables $r_s = .527$ en la época de secas, al igual que en la época de lluvias $r_s = .677$

Respuesta al tratamiento de superovulación en época de secas y lluvias

Cuadro 1

Grupo 1

Superovulación eCG Secas				Superovulación FSH + eCG Lluvias		
Identificación	Folículos \geq 10 mm	CL's	Emb. Tot.	Folículos \geq 10 mm	CL's	Emb. Tot.
755	12	19	0	16-	12	2
763	12	22	0	13	16	1
3	14	2	0	24-	1	0
754	16	3	0	29-	20	8
767	13	11	1	17-	13	3
773	22	0	0	15-	0	0
772	16	6	0	20-	0	0
71	15	1	2	23-	21	4
768	10	0	0	23-	0	0
776	14	1	0	36-	7	0
Total	144	65	3	216	90	18

Cuadro 2

Grupo 2

Superovulación FSH + eCG Secas				Superovulación eCG Lluvias		
Identificación	Folículos \geq 10 mm	CL's	Emb. Tot.	Folículos \geq 10 mm	CL's	Emb. Tot.
25	13	0	0	10	2	1
124	16	6	0	5	5	1
131	22	0	0	24	24	10
757	19	0	0	25	6	0
765	17	0	0	8	12	0
762	20	13	3	15	17	3
159	28	0	5	10	19	4
171	17	0	0	11	6	4
766	28	12	0	16	14	3
50	16	9	0	14	38	0
Total	196	40	8	138	143	26

CUADRO 3

EFECTO DE LA EPOCA SOBRE EL NUMERO DE FOLICULOS ≥ 10 mm Y CUERPOS LUTEOS

	SECAS		LLUVIAS	
	Total	Media \pm DE	Total	Media \pm DE
FOLÍCULOS	340	17.0 \pm 4.9 ^a	354	17.7 \pm 7.7 ^a
CUERPOS LUTEOS	105	5.2 \pm 6.8 ^a	233	11.6 \pm 9.9 ^b

Distinta literal indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.06$)

CUADRO 4

EFECTO DEL TRATAMIENTO SOBRE EL NUMERO DE FOLÍCULOS ≥ 10 mm Y CUERPOS LUTEOS

	FSH + eCG		ECG	
	Total	Media \pm DE	Total	Media \pm DE
FOLICULOS	412	22.4 \pm 6.0 ^a	282	14.1 \pm 5.0 ^b
CUERPOS LUTEOS	130	6.5 \pm 7.4 ^a	208	10.4 \pm 10.1 ^a

Distinta literal indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.06$)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 5

EFFECTO DE LA EPOCA SOBRE EL NUMERO DE EMBRIONES TOTALES, DEGENERADOS Y CONGELADOS

	EMBRIONES TOTALES		EMBRIONES DEGENERADOS		EMBRIONES CONGELADOS	
	Total	Media ± DE	Total	Media ± DE	Total	Media ± DE
SECAS	11	0.6 ± 1.3 ^a	8	0.4 ± 1.1 ^a	3	0.2 ± 0.5 ^a
LLUVIAS	44	2.2 ± 2.8 ^b	10	0.5 ± 0.8 ^a	34	1.7 ± 2.4 ^b

Distinta literal indica diferencia estadísticamente significativa (p< 0.06)

CUADRO 6

EFFECTO DEL TRATAMIENTO SOBRE EL NUMERO DE EMBRIONES TOTALES, DEGENERADOS Y CONGELADOS

	EMBRIONES TOTALES		EMBRIONES DEGENERADOS		EMBRIONES CONGELADOS	
	Total	Media ± DE	Total	Media ± DE	Total	Media ± DE
FSH + eCG	26	1.3 ± 2.2 ^a	10	0.5 ± 1.1 ^a	16	0.8 ± 1.7 ^a
ECG	29	1.4 ± 2.4 ^a	8	0.4 ± 0.8 ^a	21	1.0 ± 2.1 ^a

Distinta literal indica diferencia estadísticamente significativa (p< 0.06)

CUADRO 7

EFFECTO DE LA EPOCA Y TRATAMIENTO SOBRE EL NUMERO DE FOLICULOS ≥ 8 mm DIAS DESPUES DE LA COLECCIÓN

EPOCA	FOLICULOS	
	Total	Media \pm DE
SECAS	84	4.2 \pm 2.4 ^a
LLUVIAS	51	2.5 \pm 3.7 ^b
TRATAMIENTO		
FSH + eCG	67	3.3 \pm 3.0 ^a
eCG	68	3.4 \pm 3.3 ^a

Distinta literal indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.06$)

CAPITULO 6

DISCUSION

CONDUCTA DE CELO

La conducta de celo en respuesta al tratamiento de sincronización fue variable entre épocas, al observar que de los dos grupos en época de secas 6 animales fallaron en mostrar la conducta de celo y de estos 6 animales, 5 pertenecieron al grupo 2, por lo tanto solo 1 animal falló en mostrar conducta del grupo 1. Cabe mencionar que el grupo 2 tenía un día de diferencia en el tratamiento de sincronización, por lo que poco tiempo después de que este grupo comenzó a mostrar celo, las condiciones climáticas cambiaron y comenzó a llover y a bajar la temperatura. Según Landaeta-Hernández et al., (2002) el medioambiente es uno de los factores que afecta la expresión del estro en los animales y se ha demostrado que unos de estos factores tales como la lluvia, vientos fuertes y un aumento en la humedad, tienden a suprimir la actividad de monta en la conducta de estro (Allrich, 1993). Por lo tanto es posible que el cambio en la temperatura y la presencia de lluvia hayan afectado, inhibiendo el comportamiento estral de algunas vaquillas del grupo 2, ya que la primera etapa se llevó a cabo a principios de la época de secas, así que aunque esta época se caracteriza por una baja precipitación pluvial y una alta temperatura ambiental, es posible que los vientos fríos y algunas lluvias de la época de nortes se hayan prolongado un poco a la época de secas.

En la época de lluvias solo 1 animal de cada grupo falló en mostrar la conducta de celo, aunque en los tratamientos de SO, no todos los animales responden al tratamiento de sincronización mostrando conducta, ya que en muchos trabajos de investigación con diferentes tratamientos, siempre hay animales que no responden a la sincronización (Saumande y Chupin, 1986; Bo et al., 1994; Wherman et al., 1996). Una de las hipótesis que estos investigadores han dado para los animales que no expresan el celo, es debido a que la LH circulante de las hormonas gonadotropicas utilizadas para el tratamiento SO,

hacen al CL más resistente a la acción de la prostaglandina, por lo tanto el CL no es destruido y se inhibe la conducta de celo.

CRECIMIENTO FOLICULAR

Como lo indican los resultados, no hubo efecto de época sobre el número de folículos ≥ 10 mm ($p > 0.06$). Esto no concuerda con lo reportado por Zeron et al., (2001) quienes encontraron en vacas Holstein, un mayor número de folículos por ovario en invierno que en verano. Así mismo Zeitoun et al., (1996) estudiaron el efecto de temporada sobre la dinámica folicular de un ciclo estral en vacas Brahman y encontraron que el diámetro del folículo dominante fue menor en la época de invierno que en la primavera.

Después de observar los resultados del tratamiento sobre el número de folículos pudimos constatar el crecimiento de un mayor número de folículos con el tratamiento de FSH combinada con eCG versus eCG sola ($p < 0.06$). De manera contraria Schallenberger et al., (1988) al comparar eCG versus FSH-p obtuvieron un mayor número de folículos en respuesta al tratamiento de SO con eCG.

Los resultados de este estudio muestran que la combinación de estas dos hormonas tiene un mejor efecto sobre el crecimiento folicular que si se aplica eCG únicamente.

NUMERO DE CUERPOS LUTEOS

Los resultados obtenidos sobre el número de CL por ultrasonografía, indicaron que la época tuvo un efecto significativo sobre esta variable, al obtener la mejor respuesta en le época de lluvias vs época de secas (Cuadro 3). Lo que concuerda con lo encontrado por Tribulo et al., (1991) al superovular vaquillas *B. Indicus*, obteniendo la mejor respuesta en época de verano que en invierno.

A pesar de que los bovinos son considerados como no estacionales debido a que ovulan durante todo el año, la estacionalidad en los cebuinos ya ha sido objeto de investigación, de esta manera Stahringer et al., (1990) encontraron un mayor

número de animales en anestro en época de invierno. Mezzadra et al., (1993) reportaron en animales *B. Indicus* un incremento en la incidencia de vacas en anestro cuando los días eran mas cortos. Zeitoun et al., (1996) al trabajar con animales Brahman encontraron que en un ciclo estral normal los niveles de P_4 fueron mayores en época de primavera que en época de Invierno. Morrow, (1986) menciona que en zonas tropicales mas del 60 % de las preñeces se llevan a cabo de junio a agosto, que es cuando las pasturas están generalmente a su máximo. Por lo que ciertos factores como la temperatura, humedad y nutrición a través del año en las diferentes épocas, influye directamente sobre la actividad reproductiva de animales en ciclos estrales normales (Tucker, 1982; Hernandez et al., 1986) así como en animales sometidos a tratamientos de SO (Siddiqui et al., 1999).

El efecto del tratamiento sobre esta misma variable no tuvo efecto significativo ($p>0.06$). Esto no concuerda con lo obtenido por otros investigadores en trabajos donde han comparado estas dos hormonas. Goulding et al., (1991) encontraron una diferencia favorable al tratamiento con FSH-p en un estudio comparativo con eCG. Estos resultados tampoco concuerdan con lo encontrado por Mapletoft et al., (1990) al realizar un estudio comparativo entre Folltropin, FSH-p, eCG y eCG plus anti-eCG, donde este último tratamiento obtuvo la mejor respuesta. A pesar de que no hubo diferencia en la respuesta, el número de CL encontrados a la ultrasonografía fue similar al de algunos trabajos (Mapletoft et al., 1988, 1990).

Al analizar y tratar de correlacionar el número de CL con el número de embriones totales, no hubo relación entre las mismas. Una de las explicaciones que podemos dar a lo sucedido es que los folículos se pudieron haber luteinizado y que los cuerpos lúteos que se observaron en la ultrasonografía realmente eran folículos luteinizados, ya que la diferenciación entre una estructura y otra, solo se puede realizar con técnicas histológicas (Monniaux et al., 1983).

Según Mojtaba y McGowan, (1997) la luteinización folicular es una de las anomalías que se presentan durante la SO e inclusive en la sincronización

con GnRH en borregos. Hay algunos estudios en los cuales se ha encontrado una correlación de las concentraciones de estradiol y la presencia de esta anomalía (Bartlewski et al., 2001; Saumande, 1980). Ahora si tomamos en cuenta que el estradiol aumenta en grandes cantidades su concentración durante la SO alcanzando en algunos estudios hasta 100 pg/ml (Guilbault et al., 1992) podríamos pensar que la luteinización folicular ocurrió en este trabajo. Tribulo et al., (1991) encontraron diferentes porcentajes de folículos luteinizados (36, 5 y 14%), al aplicar FSH-p con diferentes cantidades de LH. Reforzando nuestro argumento Monniaux et al., (1983) correlacionaron el número de folículos luteinizados con el número de folículos atresicos, ya que los folículos atresicos pueden ser rescatados de este proceso por estimulación gonadotrópica y reiniciar su crecimiento, por lo que estos folículos no tienen la maduración adecuada cuando se da el pico de LH, no ovulan y se luteinizan. Algunos otros folículos que no estaban en el proceso de atresia también pueden experimentar este proceso. Si tomamos en cuenta que uno de los efectos del BE aplicado al inicio de la sincronización, es el de atresiar los folículos presentes, y que en el grupo 1 el tratamiento gonadotrópico se aplicó 6 días después del inicio de la sincronización y en el grupo 2 a los 4 días, podríamos suponer que el tratamiento de SO reinició el crecimiento de los folículos sobre los cuales actuó el BE y de esta manera se presentará la luteinización folicular.

Otro factor que pudo haber afectado los resultados es la progesterona, si tomamos en cuenta que esta puede aumentar su concentración después de 24 h de comenzado el tratamiento de superovulación con eCG (Saumande y Lopez-Sebastian, 1982) y FSH (Barnes et al., 1982) y que ésta inhibe la frecuencia pulsátil de LH, así como el estradiol modifica la amplitud de los pulsos de LH (Goodman y Karsch, 1980; Martin, 1984), podríamos pensar que la disminución en la frecuencia de los pulsos de LH en los tratamientos de SO también pudo haber influido en la respuesta. De acuerdo con esto, Gosselin et al., (2000) encontraron una disminución en la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH y al mismo tiempo un aumento en las concentraciones de estrógenos y progesterona. De

igual forma hay otros trabajos que confirman lo anterior, Bevers et al., (1989) registraron en un trabajo, que la frecuencia pulsátil de LH en el grupo control fue de 9.5 pulsos cada 8 h y en el grupo tratado disminuyó a 3.2 pulsos cada 8 h. Price et al., (1999) encontraron resultados similares de 6.4 pulsos en el grupo testigo y 2.4 en el tratado con Folltropin y eCG respectivamente. Debido a todo lo anteriormente comentado podemos pensar que todo esto estuvo involucrado con la pobre respuesta que se obtuvo en este trabajo.

ESTRUCTURAS RECUPERADAS

Los resultados nos muestran una diferencia significativa ($p < 0.06$) en cuanto a número de embriones totales en las dos épocas en las que se aplicó el tratamiento. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Tribulo et al., (1991) al superovular vacas cebú en época de verano e invierno, administrando FSH con diferentes cantidades de LH en la preparación y donde obtuvo una mejor respuesta en época de verano con 9.6 embriones, que en invierno con 1.6. Lo encontrado por este autor en verano es muy superior al resultado que se obtuvo en este trabajo, pero los resultados obtenidos en invierno coinciden con los de nuestro estudio. De igual manera, Hasler et al., (1983) encontraron un efecto de época al evaluar la respuesta de vacas Holstein clasificadas como fértiles e infértiles y encontrar diferencias significativas en cuanto a número de huevos fertilizados en las cuatro épocas del año; invierno, primavera, verano y otoño.

Si es cierto que con estos tratamientos de superovulación hubo un número muy bajo de embriones, debido a lo anteriormente comentado, la época del año también jugó un papel muy importante en la respuesta de los animales a los tratamientos, ya que hay estudios que confirman que los factores climáticos; humedad, temperatura y fotoperiodo afectan de diferente manera la dinámica folicular de animales *B. taurus* y *B. indicus* (Rocha et al., 1998).

Aunque en cebuinos, la calidad de los ovocitos no es afectada por la época del año, a diferencia de animales Holstein en los cuales la calidad de los ovocitos es mejor en invierno que en verano (Rocha et al., 1998). Rhodes et al., (1995)

demonstraron que la duración del intervalo interovulatorio, persistencia del CL, máximo diámetro del primer folículo dominante, máximo diámetro del folículo ovulatorio, y diámetro del CL, se relacionaron con el fotoperiodo. Si es así, tal vez la disminución en la respuesta de animales cebuinos a los tratamientos en época de invierno, sea un problema en los mecanismos endocrinos que desencadenan la ovulación, aunque esta hipótesis sería parte de otro estudio.

El tratamiento no tuvo efecto significativo sobre el número de estructuras recuperadas. Estos resultados no concuerdan con lo obtenido por Goulding et al., (1991) en un trabajo comparativo entre eCG versus FSH-p donde encontraron un efecto de tratamiento sobre el número de embriones recuperados. Boland et al., (1991) también reportaron un mayor número de estructuras recuperadas después de utilizar Folltropin-V comparado con eCG sola. Caccia et al., (1999) obtuvieron un mayor número de estructuras recuperadas (6.5 ± 1.3) comparando con lo obtenido en este trabajo al utilizar un tratamiento parecido al nuestro, combinando FSH con una dosis baja de eCG. En muchos trabajos se ha establecido la superioridad en la respuesta al tratamiento gonadotrópico al utilizar Folltropin-V comparado con otras preparaciones, en el presente trabajo no fue el caso, al obtener resultados muy similares con los diferentes tratamientos.

NUMERO DE EMBRIONES CONGELABLES Y DEGENERADOS

Como pudimos observar en el presente trabajo, los resultados nos muestran un efecto de época en el número de embriones transferibles, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Molina, (2000) en el lote testigo al presentarse en su trabajo un efecto de época. De igual manera Bastidas y Randel, (1987) al trabajar con 813 vacas Brahman y 1841 colecciones durante 7 años encontraron que la época afecta la cantidad de embriones por animal clasificados como transferibles, al obtener la menor respuesta durante el invierno vs primavera, verano y otoño. De igual manera que el presente estudio, Tegegne et al., (1999) también encontraron un efecto de época en animales cruzados, al

presentarse una mejor respuesta en época de lluvias que en secas. Contrario a lo que se encontró en nuestro trabajo, Siddiqui et al., (1999) también presentaron un efecto de época al colectar un mayor número de embriones viables en invierno, aunque los animales utilizados fueron de la raza Holstein, para los cuales es la época de confort.

El tratamiento no tuvo efecto sobre el número de embriones congelables en este trabajo. Mapletoft et al., (1990) al trabajar con cuatro diferentes tratamientos no obtuvieron diferencia en los tratamientos donde aplicaron Folltropin-V y eCG – Anti eCG, aunque estos si tuvieron diferencia con los tratamientos donde se aplicó eCG sola sin Anti – eCG y FSH-p. Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado por Caccia et al., (1999) al no haber diferencias en su trabajo donde aplicaron tratamientos semejantes a los del presente estudio, aunque el número de embriones congelables fue mucho mayor a los de nuestro trabajo. De manera contraria a los resultados obtenidos Goulding et al., (1991) encontraron diferencias entre animales tratados con FSH-p y eCG.

Los embriones degenerados no se vieron afectados por la época del año en la cual se aplicó el tratamiento, estos resultados concuerdan con lo encontrado por Siddiqui et al., (1999) al no encontrar diferencia ($p < 0.01$) en el número de embriones degenerados en diferentes épocas del año.

El tratamiento de igual manera no tuvo efecto sobre el número de embriones degenerados. Lo que contrasta con lo encontrado por Goulding et al., (1991) al comparar FSH-p y eCG y reportar un mayor número de embriones degenerados con FSH-p que con eCG. Cabe mencionar que el número de embriones obtenidos en este estudio fue un poco bajo si tomamos en cuenta otros trabajos (Mapletoft et al., 1990; Caccia et al., 1999) Esto tal vez pudo influir al analizar los resultados de esta variable.

NUMERO DE FOLÍCULOS DESPUÉS DE LA COLECCIÓN

Es importante mencionar que esta variable no estaba contemplada en este estudio, aunque al realizar el examen ultrasonografico para la evaluación de los CL se observó la presencia de folículos en el ovario, por lo que consideramos importante registrar esa información y analizarla. Aunque otros trabajos han registrado estos folículos pero al momento de la colección embrionaria es posible que al haber nosotros registrado los folículos cinco días después de la colección, algunos folículos ya se hubieran atresiado por acción de la progesterona.

Como indican los resultados, el ultrasonido que se realizó en este trabajo cinco días después de la colección nos muestra la aparición de folículos que no ovularon y que son estrogenicamente activos varios días después, esto quiere decir que las hormonas que utilizamos en nuestro tratamiento no se eliminan tan rápido y por lo tanto continúa su actividad estimuladora varios días después de su aplicación.

Los resultados muestran que la época del año también tuvo un efecto sobre el número de folículos presentes en los ovarios días después de la colección. Con respecto a esto Tegegne et al., (1999) no encontraron diferencia entre el número de folículos presentes a la colección en épocas diferentes. Actualmente hay muy pocos estudios que nos muestren el efecto de la época.

Si observamos los resultados de ésta variable (Cuadro 7) crecimiento folicular y CL (Cuadro 3), podemos observar cosas interesantes si notamos que no se presentó un efecto de época sobre el crecimiento folicular al promediar 17 ± 4.93 y 17.7 ± 7.72 folículos ≥ 10 mm en secas y lluvias respectivamente, pero este efecto si se presentó en la variable número de CL al registrarse 5.25 ± 6.86 y 11.65 ± 9.88 para las mismas épocas, aunque en el número de folículos ≥ 8 mm después de la colección también se presentó un efecto de época, este fue de manera inversa, es decir, en época de secas hubo un mayor número de estos folículos y un menor número de CL, en época de lluvias se presentó un menor número de folículos ≥ 8 mm pero un mayor número de cuerpos lúteos, con esto podemos ver que ovularon un mayor número de folículos en época de lluvias. Estas observaciones tal vez se

expliquen si tomamos en cuenta lo anteriormente comentado sobre el papel que pueden jugar los factores ambientales sobre la respuesta a los tratamientos.

Con respecto al tratamiento, los resultados no muestran un efecto significativo ($p > 0.06$) sobre el número de folículos presentes en los ovarios días después de la colección. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Bo et al., (1994) donde reportan un promedio de 1.9 y 3.3 folículos a la hora de la colección embrionaria, utilizando 200 y 400 mg de FSH-p. De igual forma Saumande, (1980) obtuvo resultados semejantes a los obtenidos en este trabajo al trabajar con eCG en diferentes días del ciclo estral. Sin embargo Goulding et al., (1991) encontraron un mayor número de folículos en el grupo con eCG en un trabajo comparativo eCG vs FSH-p el día de la colección embrionaria. Este efecto no se presentó en nuestro trabajo, aunque cabe mencionar que el tratamiento con FSH se combinó con una dosis baja de eCG. La aparición de estos folículos resulta en un ambiente uterino elevado en estrógenos que tiene un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario y el cual nos puede producir embriones degenerados, aunque en este trabajo no hubo un gran número de embriones recuperados por lo que tal vez este efecto negativo no se hizo evidente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

- 1.- La respuesta al tratamiento de superovulación de vaquillas brahman de 24 meses de edad no fue buena al obtener una cantidad muy pobre de embriones en respuesta a los tratamientos
- 2.- La época del año afectó de manera más importante la respuesta de los animales a los tratamientos de superovulación que el tratamiento.
- 3.- El mayor número posible de embriones se puede obtener en época de lluvias y por lo tanto, la respuesta al tratamiento es más efectiva cuando se aplica en ésta época que en secas.
- 4.- La calidad de los embriones no fue afectada ni por la época del año, ni por el tratamiento utilizado en este estudio.

CAPITULO 8

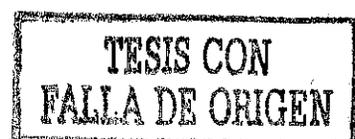
REFERENCIAS

1. FIRA Boletín informativo. Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México. Num. 317, Vol. XXXIII, 2001.
2. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, and Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1992a; 94, 177-188
3. Adams GP, Matteri RL, and Ginther OJ. Effect of progesterone on growth of ovarian follicles emerges of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1992b; 95, 627-640
4. Allrich D.R. Oestrous behaviour and detection in cattle. *Vet. Clin. North Am.* (Review) 1993; 9, 249-262
5. Anta E, Rivera JA, Galina C, Porras A, y Zarco L. Análisis de la información publicada en México sobre eficiencia reproductiva de los bovinos. II. Parámetros reproductivos. *Vet. Méx.* 1989; 20, 11-17
6. Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1993; 39, 7-24
7. Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M, and Wolfenson D. Effect of environmental heat stress on follicular steroidogenesis and development in lactating Holstein cows. *Theriogenology.* 1993; 39, 797-810
8. Badinga L, Thatcher WW, Wilcox CJ, Morris G, Entwistle K, Wolfenson D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol 17 β , progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. *Theriogenology.* 1994; 1263-1274
9. Barnes MA, Martinez-Castellano A, Kasmer GW, Wade RJ, and Halman RD. Effect of exogenous FSH on oestrous, ovulation and endogenous hormone release in dairy cows. *Theriogenology.* 1982; 18, 311-323
10. Bartlewski PM, Beard AP, Chapman CL, Nelson ML, Palmer B, Aravindkshan J, Cook SJ, Rawlings NC. Ovarian responses in gonadotrophin-releasing

- hormone treated anoestrous ewes: Follicular and endocrine correlates with luteal outcome. *Reprod. Feril. Dev.* 2001; 13 (2-3): 133-142
11. Bastidas P, and Randel RD. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology*. 1987; 28 (4): 531-540
 12. Basurto CH. Relación entre algunas variables ambientales con la producción de leche y la eficiencia reproductiva en vacas F1 (Holstein x indobrasil) en el trópico húmedo de México. Tesis de Maestría FMVZ, UNAM. 1992.
 13. Bevers MM, Dieleman SJ, Van Tol HTM, Blanckstein DM, and Van den Broek J. Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 87, 745-754
 14. Bielanski A, Surujballi O, Thomas EG, and Tanaka E. Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjobovis*. *Anim. Reprod. Sci.* 1998; 54, 65-73
 15. Biggers BG, Geisert RD, Wettermann RP, and Buchanan DS. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J. Anim. Sci.* 1999; 64, 1512-1518
 16. Bindon BM, Piper LP, Cahill LP, Driancourt MA, and O'Shea T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*. 1986; 25, 53-70
 17. Bo GA, Hockley DK, Nasser LF, and Mapletoft RJ. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Follitropin-V in beef cattle. *Theriogenology*. 1994; 42, 963-975
 18. Bo GA, Gergfelt DR, and Mapletoft RJ. Follicle wave dynamics and superovulation cattle: recent advances and practical experience. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre (supl.)* 1996; 24, 31-52
 19. Bo GA, Tribulo H, Caccia M, and Tribulo R. Superovulatory response of beef heifers treated with estradiol benzoate, progesterone and CIDR-B vaginal devices. *Theriogenology. (Abstr.)* 1998; 49, 375

20. Boland MP, Goulding D, and Roche JF. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*. 1991; 35 (1): 5-17
21. Boland MP, Kennedy LG, Crosby TF, and Gordon I. Superovulation in the cow using PMSG or HAP. *Theriogenology*. 1981; (Abstr.) 15 (1): 110.
22. Bosu WT, and Peter AT. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 1987; 28, 725-736
23. Braileanu GT, Albanese C, Card C, and Chedrese PJ. FSH bioactivity in commercial preparation of gonadotrophins. *Theriogenology*. 1998; 49, 1031-1037
24. Britt JH. Impact of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Bov. Pract.* 1992; 24, 39-43
25. Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, and Bo GA. Effect of pretreatment with eCG on superovulatory response in beef cattle treated with CIDR-B, estrogen and progesterone. *Theriogenology*. (Abstr.) 1999; 51, 403
26. Callesen H, Greve T, and Hyttel P. Premature ovulations in superovulated cattle. *Theriogenology*. 1986; 28, 155-166
27. Cushman RA, DeSouza JC, and Hedgpeth VS. Britt J.H. Effect of long term treatment with recombinant bovine somatotrophin and estradiol on hormone concentration and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology*. 2001; 55, 1533-1547
28. D'Occhio MJ, Sudha G, Jillella D, Whyte T, Maclellan LJ, Walsh J, Trigg TE, Miller D. Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology*. 1997; 47, 601-613
29. D'Occhio MJ, Jillella D, and Lindsey BR. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: Opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology*. 1999; 51, 9-35

30. De la Torre JF, Castro MA, González-Padilla E, y Reynoso O. Respuesta de vacas Cebú a superovulaciones sucesivas con FSH. *Tec. Pec. Mex.* 1992; 30, 223-231
31. Dieleman SJ, Bevers MM, and Gielen J.Th. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. *Theriogenology*. (Abstr.) 1987; 27, 222
32. Diershke DJ, Chaffin CL, and Hutz RJ. Role and site of estrogen action in follicular atresia. *Trends Endocrinol. Metab.* 1994; 5, 215-219
33. Duta JC, Barman NN, and Baruah RN. Blood biochemical profile and microbial spectrum in repeat breeder cows. *Indian Vet. J.* 1991; 68, 435-438
34. Ealy AD, Howell JL, Monterroso VH, Arechiga CF, and Hansen PJ. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *J. Anim. Sci.* 1995; 73, 1401-1407
35. Edwards JC, and Hansen PJ. Differential of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 1997; 46, 138-145
36. Elsdon RP, and Kessler RM. Superovulation of Nelore cows and heifers. *Theriogenology*. 1983; 19, 127
37. Finch VA. Body temperature in beef cattle: Its control and relevance to production in the tropics. *J. Anim. Sci.* 1986; 62, 531-542
38. Frisch JE, Munro RK, and O'neill CJ. Some factors related to calf crops of Brahman, Brahman crossbred and Hereford x Shorthorn cows in a stressful tropical environment. *Anim. Reprod. Fertil.* 1987; 15, 1-26
39. Gandhi RS, Singh A, and Gurnani M. Genetic gain from MOET in Sahiwal herds of different sizes. *Indian J. Dairy Sci.* 1998; 51 (3): 152-156
40. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Copen. Tercera edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México D.F. 1981; 143-201
41. Ginther OJ, Kastelic JP, and Knopf C. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Repr. Sci.* 1989; 20, 187



42. Gong JG, Armstrong DG, Baxter G, Garnsworthy PC, and Webb R. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *J. Reprod. Fertil. (Abstr.)* 1999; 23, 22
43. González A, Lussier JG, Carruthers TD, Murphy BD, and Mapletoft RJ. Superovulation of beef heifers with Folltropin: A new preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*. 1990; 33, 519-529
44. Goodman RL, and Karsch FJ. Pulsatile secretion of luteinizing hormone? Differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*. 1980; 107, 1286-1290
45. Gosselin N, Price CA, Roy R, and Carriere PD. Decreased LH pulsatility during initiation of gonadotrophin superovulation treatment in the cow: evidence for negative feedback other than estradiol and progesterone. *Theriogenology*. 2000; 54, 507-521
46. Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP, and Roche JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology*. 1990; 34 (4): 767-777.
47. Goulding D, Williams DH, Roche JF, and Boland MP. Superovulation in heifers using either pregnant mares serum gonadotrophin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. *Theriogenology*. 1991; 36 (6): 949-955
48. Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, Roullier P, and Matton P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fertil.* 1991; 91, 81-89
49. Guilbault LA, Lussier JG, and Grasso F. Interrelationships of hormonal and ovarian responses in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*. 1992; 37, 1029-1040
50. Halley SM, Rhodes RC, McKellar LD, and Randel RD. Successful superovulation, non surgical collection and transfer of embryos from Brahman cows. *Theriogenology*. 1979; 12, 97-105

51. Hammond AC, Chase CC, Bowers EJ, Olson TA, and Randel RD. Heat tolerance in Tuli-Senepol and Brahman-Sired F1 Angus heifers in Florida. J. Anim. Sci. 1998; 76, 1568-1577
52. Hammond AC, Olson TA, Chase CC, Bowers EJ, Randel RD, Murphy CN, Vogt DW, Tewolde A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus and Hereford Cattle in Florida. J. Anim. Sci. 1996; 74, 295-303
53. Hansen PJ. and Arechiga CF. Strategies for managing reproduction in heat stressed dairy cows. J. Dairy Sci. 1999; 82, (suppl. 2) 36-50
54. Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopez FF, Al-katanani YM, Krininger CC, Chase Jr. CC. Adverse impact of heat stress on embryo production causes and strategies for mitigation. Theriogenology. 2001; 55, 91-103
55. Harrison LM, Hansen TR, and Randel RD. Evidence for seasonal and nutritional modification of ovarian and pituitary function in crossbred heifers and Brahman cows. J. Anim. Sci. 1982; 55, 649
56. Hasler JF. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. J. Dairy Sci. 1992; 75, 2857-2879.
57. Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, and Foote RH. Superovulatory responses of holstein cows. Theriogenology. 1983; 19 (1): 83-98
58. Henricks DM, Rone JD, Ferrell CL, and Echternkamp SE. A note of the effect of nutrition on ovulation and ovarian follicular population in the individually fed postpartum beef heifers. Anim. Prod. 1986; 43, 557-560
59. Hernandez LJJ, Roman PH, Koppel RE, Padilla RF, Perez SJ, Castillo RH. Comportamiento reproductivo del ganado bovino lechero en clima tropical. 7. Niveles preovulatorios de hormona luteinizante en tres genotipos durante dos épocas del año. Tec. Pec. Mex. 1986; 50, 53-63
60. Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. Fertil. Steril. 1982; 38, 281
61. Huber JT, Higginbotham G, Gomez-Alarcon RA, Taylor RB, Chen KH, Chan KS, Wu A. Heat stress interactions with protein supplemental fat and fungal cultures. J. of Dairy Sci. 1994; 77, 2080-2090

62. Huhtinen M, Rainio V, Aalto J, Bredbacka P, and Mäki-Tanila A. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*. 1992; 37 (2): 457-463
63. Humblot P, Negrao S, and Nibart M. Effects of high energy supply and metabolic status on superovulatory response and embryo production in dairy heifers. *Theriogenology*. (Abstr.) 1998; 49, 378
64. Jillela D, and Baker AA. Superovulation in the prepuberal calf. *Theriogenology*. 1981; (Abstr.) 15 (1): 120
65. Jillela D, Eaton RJ, and Baker AA. Successful transfer of a bovine embryo through a cannulated fallopian tube. *Vet. Rec.* 1977; 100, 385-386
66. Jolly DP, McDougall S, Fitzpatrick AL, Macmillan LK, and Entwistle WK. Physiological effects of under nutrition on postpartum anoestrus in cows. *J. Reprod. Fertil.* 1995; 49, 477-492
67. Kastelic JP, Knopf L, and Ginther OJ. Effect of day of prostaglandin treatment on selection on development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 1990; 23, 169-180.
68. Kelly P, Duffy P, Roche JF, and Boland MP. Superovulation in cattle: Effect of FSH type and method of administration on follicular growth ovulatory response and endocrine patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 1997; 46, 1-14
69. Kohram H, Bousquet D, Durocher J, and Guilbault LA. Follicular status and superovulation in cattle: A field trial. *Theriogenology*. 1995; 43, 252.
70. Kuran M, Morley HJS, and Broadbent PJ. The response of bovine granulosa cells to different gonadotrophins in culture. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 45, 1-12
71. Landaeta-Hernández AJ, Yelich JV, Lemaster JW, Fields MJ, Tran T, Chase C, Rae OD, Chenoweth PJ. Environmental, genetic and social factors affecting the expression of estrus in beef cows. *Theriogenology*. 2002; 57, 1357-1370
72. Leibo SP. A one step method for direct non surgical transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 1984; 21, 767

73. Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK, Daily TA, Lewis PA, Butcher RL. Age, dose of FSH and others factors affecting superovulation in holstein cows. *J. Anim. Sci.* 1986; 63: 176-183
74. Lew BJ, Wolfenson D, and Median R. Heat stress affects steroid content of follicular fluid and steroid production by granulosa and theca cells in the bovine dominant follicle. In: Program of the annual meeting of the Israel Endocrine Society, Tel Aviv. Abstract. 21. Cited by Wolfenson et al. *Biol. Reprod.* 1993; 52, 1106-1113
75. Lidner GM, and Wright RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 1983; 20, 407-416
76. Longo KL, Marcinkowski DP, Gray CO, Bonham JB, Dahlhausen RD, Ludwick TM. Follicular development in prepubertal dairy heifers superovulated with FSH-p. *Theriogenology.* 1981; (Abstr.) 15 (1): 121
77. Lucy MC, Staples CR, Michel FM, and Tatcher WW. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1991; 74, 473-481
78. Madalena FE. La utilización sostenible de hembras F1 en la reproducción del ganado lechero tropical. Estudio de Producción y Sanidad animal nº 111, FAO, Roma. 1993.
79. Mapletoft RJ, González A, Lussier JG, Murphy BD, and Carruthers TD. Superovulation of beef heifers with folltropin or FSH-P. *Theriogenology.* (Abstr.) 1988; 29 (1): 274
80. Mapletoft RJ, Pawlyshyn V, Garcia A, and Bo GA. Comparison of four different gonadotrophin treatments for inducing superovulation in cows with 1;29 translocation. *Theriogenology.* (Abstr) 1990; 33 (1): 282
81. Marion GB, and Geir HT. Ovarian and uterine embriogenesis and morphology of the non pregnant female mammal. *J. Anim. Sci.* 1971; 32 (suppl. 1): 24
82. Martin GB. Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biol. Rev.* 1984; 59, 1-87



83. Mezzadra C, Hiomse A, Sampedro D, and Alberio R. Pubertal traits and seasonal variation of the sexual activity in Brahman, Hereford and Crossbred heifers. *Theriogenology*. 1993; 40, 987-996
84. Mojtaba K, and McGowan MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Rep. Sci.* 1997; 48, 137-157
85. Molina JJ. Efecto de la acción de somatotropina bovina al tratamiento de Follitropin-V sobre la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en vacas cebuínas superovuladas en dos épocas del año en el trópico húmedo Mexicano. Tesis de Maestría FMVZ, UNAM. 2000
86. Monniaux D, Chupin D, and Saumande J. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology*. 1983; 19 (1): 55-81
87. Morrow DA. Current therapy in theriogenology. 1986. 2, 304-308
88. Murphy MG, Enright WT, Crowe MA, McConnell K, Spicer LJ, Boland MP, Roche JF. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycles in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1991; 92, 333-338
89. Nolan R, Duffy P, Wade M, O'Callaghan D, and Boland MP. Effect of quantity and type of diet and frequency of transvaginal ovum aspiration on *in vitro* embryo development in heifers. *Theriogenology*. 1998; 49, 402
90. Noriega SR, Martínez BS, y Flores CR. Manual de técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos. FMVZ UNAM. 1995.
91. Paula-Lopez FF, Case CC, Al-katanani YM, Krininger CE, Rivera RM, Tekin S, Majewski AC, Ocon OM, Olson TA, Hansen PJ. Breed differences in resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock. *Theriogenology*. (Abstr.) 2001; 55, 436
92. Peter AT, Bosu WT, and DeDecker RJ. Supresion of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers alter intrauterine infusions of *E. coli* endotoxine. *J. Vet. Res.* 1989; 50, 368-373
93. Pierson RA, and Ginther OJ. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. Influence of day. *Anim. Reprod. Sci.* 1987; 14, 165-176

94. Pierson RA, and Ginther OJ. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*. 1984; 21, 495-504
95. Price CA, Carriere PD, Gosselin N, Kohram H, and Guilbault LA. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenology*. 1999; 51, 37-46
96. Qurik SM, Hickey GJ, and Fortune JE. Growth and relation of ovarian follicle during the follicular phase of estrous cycle in heifers undergoing spontaneous and Pgf_{2α} induce luteolysis. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 77, 211-219
97. Rajamahendran and Manikkam M. Effects of exogenous steroid hormones on the dominant follicle maintained by a Norgestomet implant in heifers. *Can. J. Anim. Sci.* 1994; 457-464
98. Rhodes FM, Death G, and Entwistle DW. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science*. 1995; 38, 268-277
99. Richard MW, Watterman RP, and Schoenemann HM. Nutritional anestrus in beef cows: Body weight change, body condition, luteinizing hormone in serum and ovarian activity. *J. Anim. Sci.* 1989; 67, 525
100. Rocha A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*. 1998; 49, 657-665
101. Rowe RF, Del Campo MR, Critser JK, and Ginther OJ. Embryo transfer in cattle: Nonsurgical collection techniques. *J. Vet. Res.* 1980; 41 (1): 106-108
102. Saumande J, and Chupin D. Induction of superovulation in cyclic heifers: The inhibitory effect of PMSG. *Theriogenology*. 1986; 25, 233-247
103. Saumande J, and Lopez-Sebastian D. Changes in plasma concentrations of free and conjugated oestrogens in heifers after treatment to induce superovulation and the relationship with number of ovulations. *J. Reprod. Fertil.* 1982; 66, 411-416

104. Saumande J. Concentration of luteinizing hormone oestradiol 17- β and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J. Endocrinol.* 1980; 84, 425-437
105. Saumande J, Morel A, Touze JL, Nibart M, and Humblot P. Effects of plane of nutrition and daily weight gain (DWG) on embryo production after superovulation in Holstein heifers. *J. Reprod. Fertil. (Abstr.)* 1998; 22, 9
106. Savio JD, Keenan L, Boland MP, and Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 1988; 83, 663-671
107. Schillo KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 1992; 70, 1271-1282
108. Shallenberger E, Knopf L, Veh FV, Tenhumberg H, and Aumuller R. Endocrine and ultrasonic evaluation of ovarian response in cattle to superovulation induced by continuous FSH administration, repeated FSH injections, or PMSG injection. *Theriogenology. (Abstr.)* 1988; 29 (1): 302
109. Shelton JN. Embryo transfer with mid-ventral and flank approach. *Theriogenology.* 1980; 106 (24): 514
110. Siddiqui MU, Sharma RK, and Gorani S. Effect of season on superovulation, recovery and quality of embryos in pure Holstein cows in tropical climate. *Indian J. Dairy Sci.* 1999; 4 (52): 230-232
111. Simpson RB, Chase Jr. CC, Spicer LJ, Vernon RK, Hammond AC, Rae DO. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J. Reprod. Fert.* 1994; 102, 483-492
112. Sirois J, and Fortune J. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology.* 1990; 127, 916-925

113. Sirois JD, and Fortune JE. Ovarian Follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. Biol. Reprod. 1988; 39, 308-317
114. Soumano K, and Price CA. Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. Biol. Reprod. 1997; 56, 516-522
115. Soumano K, Lussier JG, and Price CA. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. J. Endocrinol. 1998; 156, 373-378
116. Spain JN, and Spiers DE. Effect of niacin supplementation on milk production and thermoregulatory responses of dairy cows. J. of Dairy Sci. (Abstr.) 1997; 80, (Supl. 1) 153
117. Spearow J. Major genes control hormone-induced ovulation rate in mice. J. Reprod. Fertil. 1988; 82, 787-797
118. Stahringer RB, Neuendorff DA, and Randel RD. Seasonal variation in characteristics of estrous cycles in pubertal Brahman heifers. Theriogenology 1990; 34, 407
119. Tegegne A, Lahlou-Kassi A, and Mukasa-Mugerwa E. The effect of season on superovulatory response, embryo yield and quality in boran and boran x friesian crossbred cows. Theriogenology. (Abstr.) 1999; 180
120. Tervit HR, and Elsden RP. Development and viability of frozen-thawed cattle embryos. Theriogenology. 1981; 15 (4): 395-403
121. Tervit HR, Coper MW, Pamela G, and Haszard GM. Non surgical embryo transfer in cattle. Theriogenology. 1980; 13 (1): 63-69
122. Tribulo H, Bo GA, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Mapletoft RJ. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. Theriogenology. (Abstr.) 1991; 35 (1): 286
123. Tucker AH. Seasonality in cattle. Theriogenology. 1982; 17 (1): 53-58



124. Villa-Godoy A. Problemas reproductivos en ganado de doble propósito mantenido en el trópico húmedo: Soluciones generadas a través de la investigación. Memoria del XVIII Simposium de Ganadería Tropical, Veracruz, ver. INIFAP-SARH 1994: 37-55
125. Villa-Godoy A. Factores nutricionales que afectan el comportamiento reproductivo del ganado bovino en el trópico. Memoria del XX Simposium de Ganadería Tropical, Veracruz, Ver. INIFAP-SARH. 1995; 87-108
126. Wehrman ME, Fike KE, Kojima FN, Bergfeld EG, Cupp AS, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE. Development of persistent ovarian follicles during synchronization of estrous influences the superovulatory response to FSH treatment in cattle. *Theriogenology*. 1996; 45 593-610
127. Wilson SJ, Kirby CJ, Koenigsfield AT, Keisler DH, and Lucy MC. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1998; 81, 2132-2138
128. Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Median R, Lew BJ, Braw-Tal R, Berman A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.* 1995; 52, 1106-1113
129. Yaakub H, O'Callaghan D, and Boland MP. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*. 1999; 51, 1259-1266
130. Zeitoun MM, Rodríguez HF, and Randel RD. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. *Theriogenology*. 1996; 45, 1577-1581
131. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sclan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*. 2001; 121, 447-454