

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION  
Y DE LA SALUD ANIMAL.**

**RESPUESTA A LA SOMATOTROPINA EN VAQUILLAS  
BRAHMAN SUPEROVULADAS EN DOS EPOCAS DEL AÑO.**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JOSE DE JESUS NUÑEZ SAAVEDRA**

TUTOR:

**DR. CARLOS MIGUEL GARCIA BOJALIL**

COMITE TUTORAL:

**DR. EVERARDO GONZALEZ PADILLA**

**DR. ALEJANDRO VILLA GODOY**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIA.

A Dios, por darme la oportunidad de seguir adelante.

A mis padres: Antonio y Celia, quienes siempre me han brindado su cariño, apoyo y confianza.

A mis hermanas: Martha, Alma y Ana por su apoyo en todo momento.

A mis eternamente niños: Abraham, Elvia y David, quienes con su perseverancia y rebeldía me demuestran que todo es posible.

A mis sobrinos: Adriana, Gaby, Abi, Manuelito, Toñito y Rafita quienes con su alegría me hacen seguir adelante con una sonrisa en mis labios.

Pero sobre todo a TI por quererme igual que yo.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: José de Jesús  
Núñez Saavedra.

FECHA: 24/MAYO/2004

FIRMA: 

## AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en particular a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, gracias por brindarme la oportunidad de educarme en sus aulas.

Al Doctor Carlos García-Bojalil por sus enseñanzas, consejos y paciencia. Muchas gracias, Doctor.

Al Doctor Jorge Avila García por brindarme su amistad, apoyo y enseñanza. Gracias por brindarme la oportunidad de conocer el fascinante mundo de los bovinos lo cual representa para mi un tesoro invaluable. Mil gracias, Doctor.

A los Doctores Everardo González Padilla y Alejandro Villa Godoy por su interés y consejos. Muchas gracias.

A mi honorable jurado, gracias por sus comentarios.

A mi amigo Polo, gracias por tu amistad y apoyo.

A todos mis amigos del CEIEPO: Toño, César I, César II, Ricardo, Rosy, Octavio, Beto y Martín. Gracias por su apoyo, pero sobre todo por su amistad.

Pero sobre todo a TI por estar siempre conmigo contando con tu apoyo incondicional. Gracias por quererme igual que yo.

## CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
2.1 Foliculogénesis	4
2.2 Oleadas Foliculares	6
2.3 Control de la Foliculogénesis	7
2.4 Reclutamiento Folicular	9
2.5 Dominancia Folicular	9
2.6 Mecanismos de Dominancia	12
2.7 Atresia Folicular	13
2.8 Superovulación	15
2.9 Somatotropina Bovina	16
2.10 Somatomedinas	17
2.11 Factor de Crecimiento Insulínico 1	17
2.11.1 Mecanismo de Acción	18
2.12 Somatotropina Bovina y Desarrollo Folicular	18
2.13 Mecanismos de Acción de la bST Sobre la Foliculogénesis	19
2.14 Somatotropina Bovina en Superovulación	20

## CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS	I
RESUMEN	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
2.1 Foliculogénesis	4
2.2 Oleadas Foliculares	6
2.3 Control de la Foliculogénesis	7
2.4 Reclutamiento Folicular	9
2.5 Dominancia Folicular	9
2.6 Mecanismos de Dominancia	12
2.7 Atresia Folicular	13
2.8 Superovulación	15
2.9 Somatotropina Bovina	16
2.10 Somatomedinas	17
2.11 Factor de Crecimiento Insulínico 1	17
2.11.1 Mecanismo de Acción	18
2.12 Somatotropina Bovina y Desarrollo Folicular	18
2.13 Mecanismos de Acción de la bST Sobre la Foliculogénesis	19
2.14 Somatotropina Bovina en Superovulación	20

3.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1	Localización	21
3.2	Unidades Experimentales, Características y Alimentación	21
3.3	Primer Periodo Experimental (Verano)	21
3.3.1	Sincronización de Estros	21
3.3.2	Detección de Celos	22
3.3.3	Formación y Preparación de Grupos	22
3.3.4	Administración de bST	22
3.3.5	Superovulación y Colección Embrionaria	23
3.4	Segundo Periodo Experimental (Otoño)	25
3.5	Análisis Estadístico	26
4.	RESULTADOS	27
4.1	Respuesta a la Sincronización Durante la Etapa de Superovulación	27
4.2	Recuperación de Estructuras y Embriones Totales	31
4.2.1	Cantidad de Óvulos y Embriones Colectados Durante el Verano	31
4.2.2	Cantidad de Óvulos y Embriones Colectados Durante el Otoño	31
4.2.3	Embriones Transferibles Promedio	32
4.2.4	Blastocitos Transferibles	33
5.	DISCUSIÓN	35
5.1	Respuesta a la Sincronización	35
5.2	Recuperación de Estructuras	36
5.3	Embriones Transferibles	37
6.	CONCLUSIONES	39
7.	LITERATURA CITADA	40



## ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS.

	PÁGINA
Cuadro1. Programa de Sincronización,y Superovulación para la Obtención de Embriones en Vaquillas Brahman.	23
Cuadro 2. Respuesta a la Sincronización con $PGF_{2\alpha}$ en la Etapa de Superovulación en Vaquillas Brahman con o sin Tratamiento de bST Durante Dos Épocas del Año	31
Cuadro 3. Cantidad de óvulos/embriones Colectados en Vaquillas Brahman Superovuladas en Dos Épocas del Año.	32
Cuadro 4. Embriones Transferibles Promedio por Vaquilla Obtenidos Como Respuesta al Tratamiento con bST en Vaquillas Brahman Superovuladas en Dos Épocas del Año.	33
Cuadro 5 Efecto de la Adición de Somatotropina Bovina (bST) en el Porcentaje de Blastocitos Obtenidos en Vaquillas Superovuladas en Dos Épocas del Año.	34
Gráfica 1. Presentación de Celos, Posterior a la Aplicación de $PGF_{2\alpha}$ en Vaquillas Brahman Superovuladas en el Verano.	27
Gráfica 2. Presentación de Celos, Posterior a la Aplicación de $PGF_{2\alpha}$ en Vaquillas Brahman Superovuladas en el Otoño.	29

## RESUMEN.

### José de Jesús Núñez Saavedra. **RESPUESTA A LA SOMATOTROPINA EN VAQUILLAS BRAHMAN SUPEROVULADAS EN DOS ÉPOCAS DEL AÑO.**

Carlos Miguel García Bojalil.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la administración de somatotropina bovina (bST), como coadyuvante en la superovulación de vaquillas Brahman durante dos épocas del año (verano y otoño), bajo condiciones del trópico húmedo mexicano. Se utilizaron 22 vaquillas puras de la raza Brahman de 22 a 30 meses de edad, distribuidas al azar en dos grupos experimentales. Se utilizó un diseño reversible simple dejando 60 días de intervalo entre cada superovulación. Los animales primeramente se sincronizaron utilizando dos dosis de PGF<sub>2α</sub> (15 mg de luprostiol), con un intervalo de 12 días entre aplicaciones. El tratamiento con bST se realizó el día 4 posterior al celo (día cero), recibiendo 500 mg de bST en el pliegue anocaudal como dosis total. El procedimiento de superovulación dio inicio 10 días después de detectado el estro, durante 4.5 días con dosis decrecientes de FSH (NIH-FSH-P1) a 12 horas de intervalo (mañana y tarde) y una dosis total de 250 mg por animal. Al día 9 del protocolo de superovulación se administraron dos dosis de PGF<sub>2α</sub> una cada 12 horas y una dosis total de 37.5 mg de luprostiol, al mismo tiempo de la aplicación de la FSH. Los animales se observaron por 30 minutos cada 12 horas para la detección de celos y se inseminaron a las 12, 24 y 36 horas posteriores al establecimiento del estro, empleando el semen de 4 sementales Brahman clasificados como excelentes al ser evaluado el semen en cuanto a motilidad, viabilidad y morfología. Las vaquillas fueron inseminadas con el mismo toro durante los dos procesos de superovulación así como por el mismo técnico inseminador. La recolección de óvulos y embriones se llevó a cabo a los 7 días posteriores al celo, por medio de la técnica no quirúrgica usando 1000 ml de solución DPBS a pH 7.2 y un catéter Foley de doble vía calibre no. 14 por cada cuerno uterino, una sonda de dos vías y un filtro EmCon para colección con malla de 75 µm. Los embriones-óvulos, fueron observados y clasificados visualmente a través de un microscopio estereoscópico. Los datos se transformaron a  $\sqrt{y+0.5}$  y se analizaron con el procedimiento para modelos lineales del SAS, incluyendo en el modelo: tratamiento, período y animal. No hubo efecto de bST en el número de mórulas (1.09 vs. 1.23; P=0.679) pero si en el número de blastocitos (3.86 vs. 0.86; P=0.001) y en el total de embriones colectados (4.95 vs. 2.09; P=0.001). Con un porcentaje mayor de blastocitos (74.11 vs. 41.35; P=0.015) que de mórulas (25.89 vs. 58.65; P=0.015). No se detectó efecto de época. Se concluye que la bST como coadyuvante en la superovulación, incrementa el número de embriones colectados, principalmente blastocitos, sin importar la época del año.

Palabras Clave: Brahman, bST, trópico húmedo, somatotropina superovulación, vaquillas.

## ABSTRACT.

José de Jesús Núñez Saavedra. **RESPONSE TO SOMATOTROPIN IN BRAHMAN HEIFERS SUPEROVULATED IN TWO SEASONS OF THE YEAR.**  
Carlos Miguel García Bojalil.

Twenty two virgin Brahman heifers (22-30 months of age), were assigned randomly to one of two experimental groups arranged in a switch back design. The experiment consisted of two periods and 60 days interval between periods allowed for recovery from superovulation procedures. Two estrous cycles were synchronized by using PGF<sub>2α</sub> IM injections (15 mg of luprostiol) and interval of 12 days between injections. On day 4 following estrus the treatment group received an injection of bST (500 mg). Superovulatory treatment was initiated on day 10 of synchronized estrous cycle and consisted of IM injections of decreasing doses of FSH twice daily at 12-h intervals during 4.5 days. A total of 250 mg of FSH was injected. On the 3rd day of FSH injection, PGF<sub>2α</sub> was given with each FSH injection (30 mg IM). When detected in estrus, each heifer was inseminated artificially by the same technician using semen from 4 selected Brahman bulls. Ova and embryos were collected by a nonsurgical procedure on day 7 after AI and flushed from the uterine lumen with 1000 ml of Dulbecco's PBS by intermittent gravity flow through a two-way, round-tip Foley catheter (14 French gauge). The recovered effluent was filtered through a 75 μm embryo filter that was washed into a flat searching dish. Ova and embryos recovered were graded visually using a stereoscopic microscope. Data were first tested to  $\sqrt{y+0.5}$  and analyzed using the general liner models procedure of SAS, including in the model: treatment, period and animal. In the bST treated group no differences were found in the number of blastocysts (3.86 vs. 0.86; P=0.001) and on the number of total embryos recovered (4.95 vs. 2.09; P=0.001). Percentage of blastocysts recovered from heifers bST-treated was major (74.11 vs. 41.35; P=0.015) than morulae (25.89 vs. 58.65; P=0.015). No differences were founded in both periods. Treatment of Brahman heifers with bST as coadyuvant on superovulation, increase the number of collected embryos, mainly blastocysts, both in summer or fall.

Key words: Brahman, bST, somatotropin, superovulation, heifers

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las necesidades de alimentos para consumo humano se han incrementado no solo en cantidad sino también en calidad en las últimas décadas.<sup>32</sup> Por lo que es necesario seleccionar y multiplicar los animales sobresalientes en cuanto a producción de leche y carne de bovinos.<sup>71</sup> Dentro de este contexto, las investigaciones en reproducción animal juegan un papel muy importante como una herramienta que permita el incremento de la producción animal. Así, una de las técnicas reproductivas que cada vez cobra mayor importancia a nivel mundial es la obtención y transferencia de embriones.<sup>6,71</sup> Esta técnica ha sido utilizada por más de 20 años en países tales como Estados Unidos, Alemania y Francia, principalmente en ganado europeo y predominantemente en razas lecheras. En México, la obtención y transferencia de embriones se ha difundido particularmente en la ganadería de leche bajo sistemas tecnificados en las regiones templadas, áridas y semiáridas, siendo escasos los trabajos realizados bajo condiciones tropicales con razas cebuínas, donde el mejoramiento genético ha permitido el desarrollo de animales sobresalientes para la producción de carne y leche en condiciones donde la multiplicación de este material genético es pieza importante para incrementar la productividad.<sup>8,65,71</sup>

Dentro del ganado cebuino, una de las razas que debido a sus características ha tenido una mejor adaptabilidad a las condiciones del trópico húmedo o seco es la raza Brahman. El ganado Brahman ha demostrado tener características adecuadas para la producción de carne en el trópico debido a su capacidad para soportar altas temperaturas y humedad ambiental, lo cual le permite producir carne bajo este clima, teniendo una buena aceptación en la ganadería nacional debido a su comportamiento productivo dentro de las zonas tropicales, por lo que se encuentra ampliamente difundido en este tipo de regiones dentro del país.<sup>8</sup>

Los programas para obtención y transferencia de embriones utilizados en vacas y vaquillas de excelente calidad genética son técnicas que comprenden evaluaciones previas en las hembras donadoras, las cuales incluyen la revisión obstétrica de los animales, el estado de salud, la condición corporal, la alimentación y como parte medular los tratamientos superovulatorios que

consisten en la administración de dosis repetidas de hormona FSH, con el objetivo principal de producir un gran número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una mayor descendencia.<sup>3,6,23,32</sup>

La variabilidad en la respuesta ovárica ha sido asociada a diversos factores que influyen en diferentes grados la respuesta superovulatoria, dentro de los cuales se encuentran aquellos que son inherentes al animal y a su ambiente, como son el estado nutricional, la historia reproductiva, la edad, la estación del año, la raza, el estado ovárico al momento del tratamiento y la repetición en los tratamientos superovulatorios.<sup>1,9,11,19,32,34,38,39,49</sup> Además de aquellos relacionados con los tratamientos utilizados para la inducción de la superovulación, entre los que se encuentran las preparaciones gonadotrópicas, los diferentes lotes de gonadotropinas, la duración del tratamiento, el momento del tratamiento con relación al ciclo estral, la dosis total de gonadotropinas, así como el uso de hormonas adicionales al tratamiento superovulatorio.<sup>11,16,18,38,63</sup>

Uno de los factores más importantes a considerar es el efecto ambiental que se da a lo largo del año, sobre todo en las regiones tropicales, donde el descenso de la temperatura durante el Invierno afecta de manera considerable la producción de pastos y consecuentemente la alimentación de los animales en pastoreo.<sup>105</sup> La época de estiaje, donde la falta de lluvia tiene un efecto directo sobre los animales provocando estrés calórico, afectando el consumo voluntario, el uso de energía para mantener la homeostasis en el organismo de los animales y la baja disponibilidad de alimento por la falta de agua.<sup>94,98</sup> Mientras que, durante la época de lluvia, la repercusión sobre los animales tiene su efecto por la proliferación de insectos, enfermedades y el maltrato de los pastos por pisoteo de los animales aunado al elevado contenido de agua en los forrajes de consumo, sobre todo bajo condiciones de pastoreo.<sup>71,94,93,104</sup>

Diferentes estudios han sido realizados con la finalidad de reducir la variabilidad en la respuesta superovulatoria y con ello mejorar la calidad de los embriones e incrementar el número de embriones transferibles.<sup>18,19,23,32</sup> Entre estos se encuentra la ablación del folículo dominante, método reconocido que mejora la sincronización de las ondas foliculares, así como los tratamientos con somatotropina bovina (bST), los cuales han demostrado que permiten el

reclutamiento de folículos entre 2 y 5 mm, incrementando el tamaño y desarrollo de los mismos al inicio de la onda folicular.<sup>47,57,76</sup> Siendo las vaquillas, en comparación con las vacas, las que mejor responden al tratamiento con bST, es posible su uso como parte del protocolo de superovulación al mejorar la calidad e incrementar el número de embriones transferibles.<sup>34,78</sup> En trabajos previos, se ha visto un efecto positivo, obteniéndose promedios de 3.5 embriones/vaquilla, los cuales sirven como precedente para investigar más a fondo, debido al beneficio que se puede aportar a la ganadería, pues es de suma importancia optimizar los recursos en aquellas zonas donde se tienen animales de alto valor genético.<sup>21,23,62</sup> Sin embargo, a pesar del conocimiento que se tiene de los factores que influyen sobre la respuesta superovulatoria, es poca la información generada en este tipo de trabajos bajo condiciones tropicales con ganado cebuino (*Bos indicus*).<sup>71</sup>

## 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.

### 2.1 Foliculogénesis.

En el feto bovino, la ovogonia se desarrolla a partir de las células germinales primordiales que han migrado hasta el ovario en la etapa de embriogénesis temprana. Alrededor del día 50 y hasta el día 130 de la gestación es el momento en el cual la ovogonia prolifera, en el caso de la especie bovina (Mauleón y Mariana 1977).

Alrededor del día 95 de la vida fetal, inicia el proceso degenerativo de las ovogonias de manera tal que la mayoría de los ovocitos producidos y que representan el 60% o más, son eliminados del ovario antes del parto.

Un segundo evento en el desarrollo da inicio aproximadamente a los 80 días de la vida fetal, momento en el cual la ovogonia inicia la meiosis, deteniendo a todos los ovocitos en el estadio de diploteno de la profase meiótica de manera que, el número de ovocitos presentes al parto representa el total disponible durante toda la vida del animal (Mauleón y Mariana 1977).

Acompañando a estos cambios se presenta la formación del folículo primordial, que consiste en el crecimiento del ovocito, la diferenciación de células aplanadas que se encuentran rodeando al ovocito a células de la granulosa y la diferenciación de una capa de células de la teca externa a la lámina basal (Richards 1980 y Hirshfield 1991).

Así, la foliculogénesis da inicio durante la vida fetal continuando en la pubertad y durante los períodos reproductivos de la vida de la hembra, formando parte de un proceso continuo e irreversible. Sin embargo, aparentemente ocurre en ausencia de gonadotropinas, por lo que el mecanismo de iniciación del crecimiento folicular no ha sido del todo dilucidado (Monniaux *et al.* 1997).

En el momento en que la capa de células de la granulosa se transforman de aplanadas a cuboidales y las células de la teca interna comienzan su diferenciación, al folículo en desarrollo se le denomina folículo primario. El crecimiento al siguiente estadio, que es el de folículo secundario es completado por la proliferación de células de la granulosa (Hirshfield 1991). Los folículos en estos estadios se describen de manera colectiva como folículos preantrales y la

aparición de folículos antrales sugiere que el desarrollo puede ocurrir independiente a las gonadotropinas, de acuerdo a los trabajos realizados por Richards en 1980 con roedores hipofisectomizados.

El siguiente estadio en el desarrollo folicular consiste en la formación de una cavidad o antro y que se encuentra llena de líquido. Los folículos antrales para el caso de los bovinos presentan un diámetro en el rango de 0.14 a 20 mm y debido a que su tasa de crecimiento folicular es muy lenta para los folículos antrales pequeños, se requieren más de dos semanas para alcanzar un diámetro de 0.3 mm (Lussier *et al.* 1987). Sin embargo, para el caso de los folículos antrales grandes (1 y 2 mm) este crecimiento es rápido (Lussier 1987). Aceptándose que la formación del antro es un evento influenciado por las gonadotropinas y en especial por la FSH como la principal hormona responsable (Roche 1996).

Una vez formado el antro, el resultado es el crecimiento folicular debido a dos procesos, el primero de ellos el ensanchamiento del antro y el segundo la mitosis de las células de la granulosa (Oktay *et al.* 1995) donde la mayor parte del incremento en el tamaño del folículo es debido al antro (Monniaux 1996).

De acuerdo a Roche (1996), el desarrollo folicular postantral se divide en tres fases a saber:

Fase de selección, donde muchos de los folículos antrales inician su crecimiento, presentando una duración estimada de 2 a 4 días.

Fase de dominancia, en la cual uno de los folículos se desarrolla a expensas de los otros. Tiene una duración de 3 días.

Fase ovulatoria, momento en que el folículo dominante alcanza las dimensiones preovulatorias. En cuyo caso el desarrollo preovulatorio final ocurre después del pico de secreción de hormona luteinizante (LH) requiriendo un tiempo aproximado de 24 h.

El período total, desde la formación del antro a la ovulación es del orden de los 60 días (Lussier *et al.* 1987).



Sin embargo, cuando un folículo entra al grupo de folículos en crecimiento, este puede seguir una de dos vías, la degeneración por atresia, sufrida por el 99% de los folículos o bien la ovulación, alcanzada por muy pocos. Es así como el intervalo desde la activación de un folículo primordial durmiente hasta su crecimiento, maduración y ovulación ha sido estimado para el caso de la vaca en 180 días (Cahil y Mauleón 1981).

## 2.2 Oleadas Foliculares.

Estudios realizados en la década de los 60s demostraron la existencia de variaciones en el tamaño de la población de folículos antrales presentes en los ovarios de las vacas durante el ciclo estral (Marion *et al.* 1968).

Es así como, tiempo después, con los avances de la ultrasonografía se hace evidente la existencia de un patrón de ondas en el desarrollo de folículos antrales en el ovario bovino (Pierson y Ginther 1984, Sirois y Fortune 1988).

De esta manera, se da un período de intensa investigación definiendo este fenómeno y quedando demostrado que al menos una y hasta tres ondas de desarrollo folicular pueden ocurrir durante un ciclo estral en el ganado bovino, en el cual las oleadas pueden iniciar al día 4 del ciclo estral y nuevas oleadas se presentarán cerca del día 10 (6-15). Cada una de las cuales presenta como característica común la selección de un folículo dominante (Ginther *et al.* 1996).

En el caso del ganado bovino, las oleadas foliculares no solo se presentan en las vacas ciclando, sino también se encuentran presentes en las becerras con una edad de dos meses. Así como tanto en ganado productor de leche como ganado productor de carne se observan las oleadas foliculares, en becerras prepúberes (Savio *et al.* 1988).

La presencia de ondas foliculares durante la gestación también ha sido comprobada, lo cual permite la colección de ovocitos a partir de vacas gestantes por medio de la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonido (Ginther *et al.* 1996). Y la técnica modificada para la colección de ovocitos provenientes de becerras prepúberes reportada por Brogliatti y Salamone en 1997.

### 2.3 Control de la Foliculogénesis.

La foliculogénesis se controla a través de diversos mecanismos de regulación como los endocrinos, parácrinos y autócrinos, los cuales proporcionan el control por medio de la estimulación selectiva e inhibición de los eventos foliculares. Entre los que se incluyen la proliferación de las células de la teca y la granulosa, su diferenciación y su consecuente muerte por atresia.

Se reconoce como el primer estadio del desarrollo folicular a la adquisición de la capacidad meiótica por parte de las células de la granulosa del folículo primordial en quiescencia (Oktay *et al.* 1995). El estímulo causante de este evento irreversible permanece aún como un importante punto no resuelto dentro del control del desarrollo folicular. Sin embargo, se cree es de naturaleza parácrina ya que ocurre antes del parto y de la pubertad; en todas las fases del ciclo estral y durante la gestación y lactancia. Además se ha demostrado estar influenciado por las gonadotropinas, en animales de laboratorio (Van Cappelin *et al.* 1989), así como su ocurrencia ser independiente a la hipófisis (Richards 1980).

El elemento celular que produce el estímulo es también desconocido, pudiendo ser el ovocito, la granulosa, la teca o el estroma ovárico. Recientes trabajos realizados, implican un elemento de origen proteico de la granulosa asociado a KIT, también conocido como steel factor y su receptor C-KIT en el ovocito, al iniciarse la foliculogénesis (Manova *et al.* 1993; Packer *et al.* 1994).

Alternativamente, Monniaux *et al.* (1997) presentó un modelo para la regulación negativa del proceso, donde hay factores que inhiben la entrada del folículo a la población en crecimiento cuya supresión inicia el crecimiento de un folículo en particular. La investigación que soporta a esta otra es la observación que los folículos primordiales, aislados de los fetos bovinos comienzan a desarrollarse *in vitro* (Wandji *et al.* 1996, Braw-Tal y Yossefi 1997).

Mientras, como supresor se encuentra el gene supresor del tumor de Wilms, un factor de transcripción que se encuentra de manera abundante en los folículos primordiales pero muy reducido en los folículos primarios y secundarios (Hsu *et al.* 1995).

La comunicación entre el ovocito y las células de la granulosa es esencial y es llevada a cabo por la conexina 43, misma que forma parte de las uniones gap entre el ovocito y las células de la granulosa lo cual que da demostrado por la ablación transgénica de la conexina 43, impidiendo el desarrollo mas allá de folículo primario (Weisen y Midgely *et al.* 1994).

Estudios realizados con animales de laboratorio al ser hipofisectomizados, inhibidos contra hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y autorregulados por disminución de la secreción de gonadotropinas (down regulation) demuestran que el desarrollo de los folículos hasta estadios de preantrales o antrales ocurre de manera independiente a las gonadotropinas (Richards *et al.* 1980, Campbell *et al.* 1995).

A pesar de que ha sido demostrada la presencia de receptores a la hormona folículo estimulante (FSH) en los folículos primarios y secundarios de los bovinos, al menos en los fetos y neonatos (Wandji *et al.* 1996), y el desarrollo cuantitativo de los folículos que pasan al estadio antral son influenciados por la FSH (Campbell *et al.* 1995), la influencia de elementos parácrinos, en particular los factores de crecimiento, son considerados parte central en el crecimiento de los folículos preantrales.

Otro factor importante es el de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), el cual se cree amplifica los efectos de la FSH en el crecimiento de los folículos antrales (Monget y Monniaux 1995).

Es así como, la ocurrencia del desarrollo folicular y la relativa ausencia de atresia durante los estadios preantrales de la foliculogénesis sugiere que el control parácrino del desarrollo folicular puede ser un proceso que se lleve a cabo en las células de la granulosa, la teca y el estroma ovárico.

#### 2.4 Reclutamiento Folicular.

El reclutamiento folicular es el proceso mediante el cual, bajo el efecto de la FSH, los folículos antrales tempranos bovinos (2-3 mm de diámetro) comienzan a crecer (Fortune 1994), iniciando una onda de desarrollo. Sin embargo, a pesar de ser un proceso importante, no ha recibido la misma atención de los investigadores como en el caso de la dominancia folicular y la ovulación.

Así, grupos más que folículos aislados son reclutados, relacionando el proceso de reclutamiento con cambios medibles de FSH circulante, manifestados en las ondas foliculares. La primera onda surge a partir de un segundo pico de secreción de FSH posterior a la ovulación (Sirois y Fortune 1988). Incrementos en la FSH circulante preceden a la segunda onda folicular.

Dentro del proceso de reclutamiento se encuentran también involucrados factores intraováricos, estimulados por la FSH, como son los IGF y las proteínas a las que estos se ligan, amplificando con esto la acción de la FSH (Monget y Monniaux 1995). Estudios revisados por Roche (1996) han mostrado 100 proteínas sintetizadas por los folículos en crecimiento, siendo la mayoría de éstas mas bien la consecuencia y no la causa del reclutamiento.

#### 2.5 Dominancia Folicular.

En la vaca, al igual que en la oveja y la yegua, el folículo dominante de una onda folicular alcanza dimensiones preovulatorias (Fortune 1994) y un solo folículo por ciclo ovula normalmente.

El mecanismo de dominancia no ha sido determinado y se hipotetiza que este se encuentra asociado con un efecto inhibitorio parácrino del folículo dominante dirigido sobre los folículos subordinados del mismo grupo en desarrollo. De ahí que, mecanismos de este tipo no pueden ser enfocados a las vacas u otras especies monovulares, donde el folículo dominante presente en uno de los

ovarios, produce también inhibición de los folículos subordinados del ovario contra lateral. Es por consiguiente, más aceptado que la dominancia se produce por un factor que tiene efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotropinas (Ginther *et al.* 1996). Entre los cuales se encuentra la inhibina, la cual es producida inicialmente por las células de la granulosa y reduce directamente la secreción de FSH (Findlay 1993). Por su unión a la activina, la follistatina reduce la secreción de FSH. Las hormonas esteroides ejercen una retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas, primeramente a nivel hipotalámico y también a nivel de la hipófisis (revisión de Everett 1994).

El desarrollo del folículo dominante hasta dimensiones preovulatorias depende estrictamente de las gonadotropinas. Investigaciones clásicas revelan el patrón de secreción de las hormonas hipofisarias y ováricas así como la evolución de los cambios en los receptores hormonales durante los estadios finales del desarrollo folicular (revisado por Richards 1980). Los folículos antrales presentan los receptores para la LH en la teca y para la FSH en la granulosa. Bajo la influencia de la LH las células de la teca sintetizan andrógenos que cruzan la lámina basal al interior del compartimiento de las células de la granulosa. Por acción de la FSH, estos andrógenos son convertidos en estrógenos por medio de la enzima aromatasa. El cambio clave durante el desarrollo de la competencia ovulatoria de un folículo, es la adquisición por las células de la granulosa de los receptores para LH. En los folículos donde esto se ha realizado, la LH actúa induciendo la síntesis de grandes cantidades de estrógenos en sinergia con FSH. Este proceso es un auto refuerzo en el que los estrógenos inducen la formación de otros receptores de LH y esta, junto con FSH producen una nueva secreción de estrógenos. Los folículos que se vuelven dominantes o estrogenoactivos producen  $1 \times 10^3$  veces más estrógenos que los folículos subordinados y tienen número considerablemente mayor de receptores tanto para LH como para FSH (Roche 1996). Esto conlleva a un rápido incremento en el diámetro folicular, producto del aumento en la cantidad del líquido folicular. Por lo que no es difícil de entender que esta rápida amplificación en la síntesis, secreción y acumulación de líquido pueda ser manifiesta fuera del ovario como un efecto endocrino, asegurando la dominancia del folículo preovulatorio. Aunado a que, producto de un incremento

en el número de receptores a FSH, el folículo dominante puede ser capaz de presentar un mayor desarrollo a bajas concentraciones plasmáticas de FSH, mientras que los folículos subordinados sucumben con estos niveles de FSH.

Son muchos los estudios que han demostrado como la FSH exógena puede incrementar el número de folículos que alcanzan el estado preovulatorio. Sin embargo, no ha sido demostrado a partir de que tipo de población folicular (recién reclutados, antro pequeño o folículos creciendo) se derivan los folículos supernumerarios.

La extirpación del folículo dominante al inicio de la onda resulta en la prolongación de la vida del segundo folículo más grande (Ko *et al.* 1991), lo cual sugiere que los folículos subordinados pueden mantener su viabilidad por algún tiempo después de su reclutamiento y podría por consiguiente representar parte de la respuesta superovulatoria. Guilbault *et al.* (1991), demostraron que la respuesta superovulatoria se reduce si es iniciada en presencia de un folículo dominante en crecimiento. Por lo que, sin duda alguna, el tratamiento a vacas sin la presencia de un folículo dominante resulta en una respuesta superovulatoria superior (Guilbault *et al.* 1991, Bungartz y Neiman 1994). De forma tal que, los folículos que responden a la superovulación sin la presencia del folículo dominante son los reclutados y los de antro pequeño, cuyo número es variable ya que está en función del momento en que la onda se encontraba al inicio del tratamiento.

## 2.6 Mecanismos de Dominancia.

Para determinar los mecanismos de dominancia folicular, se plantea la determinación de las diferencias entre los folículos dominante y subordinado. Así, el folículo dominante se distingue por la cantidad de esteroides y receptores a las gonadotropinas que presenta, en este caso superior al de los subordinados. Mientras que el IGF-1 potencializa el desarrollo del folículo, como un mitógeno, en los folículos pequeños y por su acción en conjunción con las gonadotropinas, para inducir la esteroidogénesis en los folículos antrales (Monget y Monniaux 1995) han sido establecidas diferencias claras en las concentraciones de IGF-1 o IGF-2 entre los folículos dominante o subordinado (Monget y Monniaux 1995, de la Sota *et al.* 1996). Sin embargo, existe regulación múltiple de la actividad de IGF, en particular, se conocen 6 proteínas de unión de los IGF (IGFBP) que tienen afinidad comparable a la de los receptores de IGF-1 e IGF-2 (Monget y Monniaux 1995). Se ha hipotetizado que la función de las IGFBP limita la disponibilidad de los IGF por secuestro (Monget y Monniaux 1995), y que las IGFBP-2, 4 y 5 atenúan los efectos de la FSH en otras especies de mamíferos (Guidice *et al.* 1993, Erickson 1992, Grimes *et al.* 1994).

Un estudio reciente ha mostrado que el líquido folicular de los folículos dominante y subordinado de la primera onda folicular contiene proteínas correspondientes a IGFBP-2, 3, 4 y 5 (de la Sota *et al.* 1996). Dichos hallazgos son consistentes con la hipótesis que plantea el que los folículos dominantes pueden emplear de manera más efectiva los niveles existentes de FSH debido al aumento en la disponibilidad de los IGF y que la atresia en los folículos subordinados es producto de una reducción inducida por las IGFBP sobre los IGF.

Las razones por las cuales un folículo dominante termina pueden basarse en las dinámicas de retrocontrol esteroideo-gonadotrópicas. Durante la fase lútea, los niveles de progesterona deprimen los pulsos de la LH y previenen los efectos de retroalimentación positiva del estradiol folicular para inducir el pico de secreción ovulatorio de LH. El folículo dominante presente durante la fase lútea puede ser inducido a la ovulación si el cuerpo lúteo es lisado por un tratamiento de prostaglandina, sugiriendo que es un folículo normal (Kastelic *et al.* 1990). Sin embargo, este pierde sus receptores para LH y FSH 72 horas después de

completar la dominancia (Roche 1996). En un momento dado, el folículo dominante secreta o acumula IGFBP-2 lo cual limita la disponibilidad de los IGF, atenuando la actividad de la FSH. Como consecuencia se observa una pérdida de la capacidad de producción de estrógenos y en la habilidad para sintetizar inhibina (Guilbault *et al.* 1993), lo que impide al folículo mantener el efecto sobre la secreción de FSH.

## 2.7 Atresia Folicular.

La ciclicidad ovárica y en particular el desarrollo e interrupción de las ondas foliculares cada 3 o 4 días, representa la necesidad de una remodelación total del ovario. De ahí que, un progreso importante en la investigación ha sido hecho recientemente con el entendimiento de los mecanismos que causan la muerte y desaparición de más del 99% de los folículos que entran a la población en crecimiento. La mayor parte de la degeneración folicular ocurre en el estadio antral temprano, antes del reclutamiento. Siendo evidente que los folículos reclutados que no se vuelven dominantes, así como los dominantes que no ovulan, también degeneran.

La atresia folicular fue reconocida hace mas de 100 años y los cambios morfológicos, dentro de los cuales se incluye la picnosis nuclear y la hipertrofia de las células de la granulosa, así como el aumento de la permeabilidad en la lámina basal han sido conocidos por largo tiempo (Ryan 1981). La atresia de los folículos bovinos produce pérdida de la vascularidad en la teca, degeneración del ovocito y picnosis de la granulosa (McNatty *et al.* 1984). La atresia es un proceso drástico, donde no han sido observados grupos aislados de células atrésicas en un folículo, lo que hace pensar en un fenómeno coordinado.



Las uniones gap, formadas por poros entre las células para la comunicación y transferencia entre ellas de pequeñas moléculas son consideradas importantes para el mantenimiento del compartimiento de la granulosa del folículo ya que este es avascular. Así, la pérdida de las uniones gap se produce en los folículos ovinos (Hay *et al.* 1979). Mientras que recientemente se demostró que la reducción en las proteínas de las uniones gap es un acontecimiento inicial de la atresia en los folículos de la rata ((Weisen y Migdely 1994). La atresia puede engendrar otros cambios entre las células de la granulosa, Peluso *et al.* (1996), al mostrar que la matriz extracelular de proteínas de calcio dependientes inhibe la atresia de las células de la granulosa en la rata.

El medio más común de la degeneración celular fisiológica es por apoptosis o muerte celular programada. La apoptosis es definida por Tilly *et al.* (1991), como el mecanismo de muerte celular programada en los folículos atrésicos. Y su ocurrencia ha sido confirmada en los folículos atrésicos bovinos por Jolly *et al.* (1994). Así, como se mencionó con anterioridad, las gonadotropinas y los factores de crecimiento son elementos esenciales para el mantenimiento de la población folicular, teniendo como efecto la prevención de la apoptosis (Tilly 1996). El efecto de las gonadotropinas puede ser directo ya que la apoptosis puede ser suprimida *in vitro* por medio del tratamiento con agentes que permiten la acción de las gonadotropinas (Bo *et al.* 1993). También existe evidencia de los efectos indirectos de las gonadotropinas por medio de la estimulación de los IGS o de otros elementos parácrinos entre el folículo (Tilly 1996). O bien la disminución de los IGF debido al incremento de las IGFBP, el cual puede ser un proceso por el cual se induzca apoptosis y atresia en los folículos bovinos. De forma que existe un incremento en las IGFBP-2, 4 y 5 cuando la atresia progresa en los folículos bovinos subordinados (de la Sota *et al.* 1996). Así, el proceso de atresia puede ser visto como una respuesta a la falta de gonadotropinas. En la foliculogénesis bovina normal, esto ocurre en los folículos que no son reclutados y en los que no son reclutados pero que no llegan a ser dominantes debido al retrocontrol inhibitorio de la secreción de FSH por el folículo dominante. La atresia del folículo dominante ocurre por la falta de soporte de LH necesario para continuar hasta la ovulación.

## 2.8 Superovulación.

A pesar de los avances en la investigación, la cual ha proporcionado grandes pasos para el entendimiento de los mecanismos de acción del desarrollo folicular, todavía no se puede predecir con exactitud los resultados del tratamiento superovulatorio en las vacas (Kohram *et al.* 1995). De manera que la mayor limitante en la transferencia de embriones es la variación tan grande que existe al tratamiento superovulatorio con gonadotropinas (Guilbault *et al.* 1991). Esta variación ha sido atribuida a diferentes factores, algunos de naturaleza externa como el medio ambiente, la preparación de las hormonas, el número de aplicaciones, las dosis utilizadas y muchos otros (Donaldson 1984, Murphy *et al.* 1987, Lindsell *et al.* 1987 y Guibault 1987). Sin embargo, también se han reportado factores intrínsecos relacionados al estado ovárico al momento de la superovulación como causantes de variación en la respuesta a la superovulación (Monniaux *et al.* 1983).

Debido a esta variabilidad en la respuesta, las investigaciones tienden a mejorarla en base al conocimiento del desarrollo folicular, de ahí que en la década de los 80s la investigación se enfoca al conocimiento de las ondas foliculares (Pierson y Ginther 1987), reconociendo la presencia de 2 o 3 ondas por ciclo (Roche 1996). Estudios iniciales demostraron que los tratamientos de superovulación después del día 7 del ciclo estral producían más ovulaciones y embriones (Donaldson 1984), aparentemente debido a la coincidencia con el inicio de la segunda o tercera onda folicular. Sin embargo, durante cada onda folicular se presenta un folículo dominante que inhibe el crecimiento del resto de los folículos denominados subordinados (Savio *et al.* 1988). Lo cual indica que la presencia de un folículo de mayor tamaño al inicio del tratamiento superovulatorio está asociado a una disminución en la tasa ovulatoria, lo cual también ocurre cuando la superovulación se inicia una vez que la selección del folículo dominante se ha realizado (Pierson y Ginther 1988). Por lo tanto, la presencia del folículo dominante tiene un efecto negativo sobre los tratamientos superovulatorios (Adams *et al.* 1993).

Es así como se crean diferentes técnicas con la finalidad de mejorar la respuesta superovulatoria. Entre estas se encuentra la ablación del folículo por cauterización,

aspiración o por la inducción de su ovulación utilizando LH, hCG o GnRH (Guilbault *et al.* 1991, Adams *et al.* 1992, Ginther *et al.* 1996). Un segundo método consiste en sincronizar las ondas foliculares por medio de tratamientos con hormonas esteroidales las cuales producen su efecto por bloqueo de la liberación de gonadotropinas (Bo *et al.* 1996), sin embargo, al combinarlos con los tratamientos superovulatorios no demostraron tener diferencias importantes (Bo *et al.* 1996) por lo que a pesar de su potencial, es necesario investigar y evaluar esta técnica. Otro método que ha demostrado ser útil al mejorar la respuesta a la superovulación es la administración de somatotropina bovina.

## 2.9 Somatotropina Bovina.

La somatotropina (STH), también llamada hormona del crecimiento, es una de las siete hormonas producidas por la adenohipófisis, cuya función principal como su nombre lo indica es la estimulación del crecimiento (McClary *et al.* 1990)

El primer informe acerca de la estructura de la hormona del crecimiento fue hecho por Li en 1969 y corregido por Naill en 1972. La somatotropina bovina es una cadena peptídica de 191 aminoácidos unida por 2 puentes de disulfuro, con un peso molecular de 46,000 Da, por lo cual es considerada como la principal hormona de la hipófisis anterior (Turner D, Bagnara JT 1976).

La STH es diferente para todas las especies, sin embargo la STH bovina es prácticamente igual a la STH ovina, con la diferencia de que la STH bovina presenta en el sitio 127 Valina, la cual reemplaza a Leucina en el caso de la STH ovina. La STH es producida en las células de la adenohipófisis, cuya inervación secretomotora es muy escasa, de ahí la importancia del plexo capilar primario, localizado en la eminencia media a través del cual viaja el factor liberador de la somatotropina (SRF) estimulando la secreción de STH. Al igual que muchas otras hormonas, la STH utiliza AMPc como segundo mensajero en la mediación de respuestas específicas. La secreción es inhibida por la somatostatina (GHRIH).

Sin embargo, no existe ningún control de retroalimentación sobre la secreción de la hormona del crecimiento por lo que probablemente, el control directo de las hormonas de liberación e inhibición dependen directamente del hipotálamo (Turner D, Bagnara JT 1976).

#### 2.10 Somatomedinas.

Al estudiar el efecto de la STH en el organismo se observó que no estimula directamente la incorporación de sulfato al interior del condroitin sulfato del cartílago, de ahí que se conociera la existencia de un factor de sulfatación dependiente de la STH al cual se le dio el nombre de somatomedina (Gong *et al.* 1993). Posteriormente se dieron a conocer dos factores de crecimiento llamados factores de crecimiento insulínicos o IGF el 1 y el 2 (IGF-1 e IGF-2), los cuales conforman la familia de las somatomedinas (Zhou *et al.* 1991). Cabe señalar que *in vivo* se han encontrado 4 IGF, sin embargo *in vitro* solo se conocen 2 (IGF-1 IGF-2). Quedando demostrado que la Somatotropina bovina estimula el incremento en la concentración de IGF-1 en el líquido folicular de los ovarios estimulando la proliferación de células de la granulosa en el ovario de los bovinos (Braw-Tal *et al.* 1977)

#### 2.11 Factor de Crecimiento Insulínico 1 (IGF-1).

El IGF-1 es un factor de crecimiento de bajo peso molecular (8000 Da) que tiene gran importancia en el crecimiento de células de los mamíferos, actuando por unión a un receptor específico en la membrana de las células de la granulosa en el ovario (Zhou *et al.* 1991, Gong *et al.* 1993).

### 2.11.1 Mecanismo de Acción.

El receptor a IGF-1 está formado por cuatro subunidades: 2 subunidades con peso molecular de 135,000 Da y 2 subunidades con un peso molecular de 90,000 Da. Dando entre las dos subunidades un peso molecular al receptor de 300 a 350,000 Da. El receptor tiene un precursor, el cual es un péptido de 180,000 Da que se glicosila y se clava en las subunidades (De la Sota *et al.* 1996)

El IGF-1 se une al dominio extracelular del receptor y estimula la actividad de una tirosin-cinasa específica (intracelular), provocando que la subunidad se autofosforile. De acuerdo al trabajo realizado por Gong *et al.* (1993), en el núcleo, la señal IGF-1 es captada por los receptores RNAm y se produce la síntesis de IGF-1. El IGF-1 es secretado pasando a formar parte del líquido folicular lo que permite el crecimiento folicular, en especial de los folículos pequeños (<5mm) y medianos (5 a 10 mm).

### 2.12 Somatotropina Bovina y Desarrollo Folicular.

La somatotropina bovina es conocida por su alta eficiencia en el incremento de la producción láctea en las vacas lecheras. La producción por recombinación de la somatotropina bovina (bST) data de los años 80s, destinándose su uso comercial en las vacas lecheras en lactación. Observándose un efecto colateral a la administración prolongada de la bST exógena, el incremento en la frecuencia de partos gemelares (Cole *et al.* 1991). De manera que este hallazgo incitó a los investigadores a estudiar el papel de la bST en el desarrollo folicular. Así, Gong *et al.* (1991), demostraron que la bST incrementa el número de folículos antrales del rango de 2-5 mm de diámetro reclutados durante las ondas foliculares bovinas, ocurriendo sin una aparente variación en el patrón de secreción de gonadotropinas. Posteriormente los mismos autores demostraron que la bST no afecta la secuencia de desarrollo de las ondas foliculares en el ovario, ni altera los efectos inhibitorios del folículo dominante sobre el grupo de folículos subordinados (Gong *et al.* 1993). Estudios subsecuentes revelaron una interacción entre factores nutricionales, lactación y tratamiento con bST sobre el patrón de las poblaciones foliculares. En vaquillas lecheras, la bST incrementa el número de folículos antrales pequeños del ovario, mientras que en las vacas en lactación el

incremento se dio en el número de folículos (Gong *et al.* 1996). Así como utilizar FSH en lugar de la PMSG para inducir la superovulación. Al realizar tres experimentos consecutivos en los mismos animales con tres meses de intervalo, la bST incrementó la tasa de ovulación, el número de ovocitos/embriones y el número total de embriones transferibles. En dos de los tres experimentos, el porcentaje de embriones fue incrementado en los animales tratados con bST y FSH comparados con FSH sola (Gong *et al.* 1996).

### 2.13 Mecanismos de Acción de la bST Sobre la Foliculogénesis.

Es conocido que la bST tiene efecto en la inducción de la síntesis y secreción de IGFs (Diercole *et al.* 1984) por el hígado y la insulina por el páncreas (Gong *et al.* 1993). Dada la dependencia que la foliculogénesis tiene de la insulina y los IGF, el primer pensamiento es adjudicar los efectos de la bST exclusivamente a este mecanismo (Monget y Monniaux 1995, Roche 1996). Es verdad que la bST incrementa los niveles de IGF-1 en el bovino (Gong *et al.* 1991). El efecto directo sobre el ovario es debido a la presencia de receptores para bST en el ovario bovino (Lucy *et al.* 1993). Sin embargo, estos receptores al parecer están confinados al tejido luteinizado y raramente en los folículos. Estudios realizados *in vitro* con células de la granulosa muestran que no hay efecto de la bST sobre la proliferación cuando las células derivan de folículos medianos o pequeños, por otra parte, la bST inhibió la mitosis de las células provenientes de los folículos grandes (Gong *et al.* 1993). Sin embargo, la bST por si sola incrementa la producción tanto de estradiol como de progesterona por las células de la granulosa en folículos bovinos de tres categorías en cultivos sin suero (Gong *et al.* 1994).

#### 2.14 Somatotropina Bovina en Superovulación.

Debido al incremento en el número de folículos asociados al tratamiento con bST en el ganado, fue de interés tratar de determinar si la respuesta superovulatoria podía ser incrementada con la administración de bST. Los ensayos iniciales fueron contradictorios, Herrler *et al.* (1993), reportó que el pretratamiento con bST seguido de PMSG incrementó el número de embriones producidos, mientras que Rieger *et al.* (1993), describió un efecto limitado al utilizar bST y FSH ya que no observó ningún incremento en el número de embriones transferibles. De estos trabajos se deriva que aparentemente la diferencia está en el tiempo de aplicación de la bST con respecto al inicio de la superovulación, de ahí que en investigaciones posteriores la bST fue aplicada 5 días antes de iniciado el tratamiento con PMSG en vaquilla (Gong *et al.* 1996). En el grupo control de estos trabajos, la bST sola incrementó el número de folículos antrales pequeños (<5 mm). El pretratamiento con bST previo a la administración de PMSG incrementó el número de folículos >5 mm, el número de ovulaciones y el número total de embriones, en relación con los animales no tratados y los tratados exclusivamente con PMSG. No hubo diferencia en el número de embriones transferibles, aparentemente debido a la actividad como LH de la PMSG (Monniaux *et al.* 1993). En trabajos experimentales subsecuentes, realizados por Gong *et al.* (1996) se utilizó FSH en lugar de la PMSG para inducir la superovulación. Al realizar tres experimentos consecutivos en los mismos animales con tres meses de intervalo, la bST incrementó la tasa de ovulación, el número de ovocitos/embriones y el número total de embriones transferibles. En dos de los tres experimentos, el porcentaje de embriones fue incrementado en los animales tratados con bST y FSH comparados con FSH sola.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Localización.

El trabajo experimental se llevó a cabo en la empresa pecuaria privada denominada Ganadera El Brujo, localizada en el Km. 235 de la carretera Pachuca-Tampico en el municipio de Platón Sánchez, Veracruz, México.

El rancho se localiza a 21° 17' latitud Norte y 98° 23' longitud Oeste. Presenta un clima Aw1 (e) gw'' (tropical lluvioso). La temperatura media anual es de 22.3° C y la precipitación pluvial promedio de 831 mm con lluvias durante 6 meses, principalmente en verano.<sup>30</sup>

#### 3.2 Unidades Experimentales, Características y Alimentación.

Se utilizaron 22 hembras nulíparas de la raza Brahman, de 22 a 30 meses de edad. Las vaquillas fueron observadas en estro cuando menos en dos ocasiones previas al inicio del trabajo. A la palpación rectal se detectó que se encontraban ciclando, no estaban gestantes y carecían de problemas reproductivos como quistes y malformaciones cervicales.

Dos meses antes del inicio del trabajo y durante todo el periodo experimental, los animales recibieron una alimentación que comprendió el aporte en forraje a través del pastoreo rotacional controlado en potreros de zacate estrella (*Cynodon plectostachyus*) y 2.0 kg/vaquilla/día de alimento concentrado ofrecido en comederos móviles directamente en el potrero, conteniendo 15% de proteína y 2.1 Mcal/kg de energía neta.

#### 3.3 Primer Periodo Experimental (Verano).

##### 3.3.1 Sincronización de Estros.

El primer periodo experimental inició en el mes de agosto con la aplicación de una inyección intramuscular (IM) de Prosolvin® , equivalente 37.5 mg de PGF<sub>2α</sub>. (día - 14).<sup>6,25</sup> Una segunda inyección de Prosolvin®, (37.5 mg de PGF<sub>2α</sub>) 12 días después con respecto a la primera aplicación de PGF<sub>2α</sub> permitió sincronizar el ciclo estral de las 22 vaquillas.<sup>6,25</sup> (Cuadro 1)



### 3.3.2 Detección de Celos.

Para facilitar la detección de celos, las vaquillas fueron pintadas con crayón marcador en el maslo de la cola.<sup>60</sup> Las vaquillas fueron observadas por periodos de 15 minutos con intervalos de una hora. Los celos fueron detectados mediante el uso de dos toros celadores con el pene desviado y un arnés marcador (chinball), estableciendo que una vaquilla estaba en celo cuando ésta se quedaba completamente quieta al ser montada por el toro celador u otra vaquilla; el dorso del animal estaba pintado por efecto del chinball y/o el crayón marcador del maslo de la cola había sido borrado.<sup>60,31</sup>

### 3.3.3 Formación y Preparación de Grupos.

Todas las vaquillas estaban identificadas por medio de aretes plásticos en la oreja. Las vaquillas fueron separadas aleatoriamente en dos grupos de 11 animales cada uno. Al momento de ser organizadas por grupo, se pintaron con crayón en los costados los números 1 a 11 para las vaquillas del grupo 1 y del 12 al 22 para las del grupo 2.

### 3.3.4 Administración de bST

Una vez formados los grupos, uno de ellos (grupo 1) recibió una inyección subcutánea en el pliegue anocaudal con una dosis de 500 mg de somatotropina bovina (bST), cuatro días después de la presentación de celo.<sup>16,19</sup> (Cuadro 1)

### 3.3.5 Superovulación y Colección Embrionaria

Diez días posteriores a la presentación del celo se dio inicio a la superovulación de las vaquillas aplicando inyecciones intramusculares (IM) con dosis decrecientes de hormona folículo estimulante (FSH) a intervalos de 12 horas durante 4.5 días, recibiendo una dosis total de 250 mg de NIH-FSH-P1<sup>18,23,39,41,56,59</sup> (Cuadro 1).

Cuadro1. Programa de Sincronización y Superovulación para la Obtención de Embriones en Vaquillas Brahman

DÍAS	TRATAMIENTO	
Día -14	37.5 mg de PGF <sub>2α</sub> <sup>a</sup> IM por Donadora <sup>6,23</sup>	
Día - 2	37.5 mg de PGF <sub>2α</sub> IM por Donadora	
Día 0	CELO	
Día 4	Grupo Tratado: 500 mg de bST <sup>b</sup> por vaquilla <sup>14,17</sup>	
	7:00 A.M.	7:00 P.M.
Día 10	40 mg de FSH <sup>c</sup>	40 mg de FSH <sup>16,21,36,38,50,59</sup>
Día 11	30 mg de FSH	30 mg de FSH
Día 12	30 mg de FSH	30 mg de FSH
Día 13	20 mg de FSH	20 mg de FSH
	15 mg de PGF <sub>2α</sub>	22.5 mg de PGF <sub>2α</sub> <sup>23,47</sup>
Día 14	10 mg de FSH	
	DETECTAR CALORES	DETECTAR CALORES
Día 15 y 16	Inseminación artificial 12-24-36 horas posteriores al establecimiento del celo	
Día 22	Recuperación de Embriones	

<sup>a</sup>Prosolvín®, 15 mg/ml luprostiol, Intervet, Boxmeer, Holanda.

<sup>b</sup>Lactotropina®, 500 mg bST, Monsanto, Bruselas, Bélgica.

<sup>c</sup>Folltropin-V®, 400 mg/20 ml NIH-FSH-P1, Vetrepharm, Ontario, Canadá.

El penúltimo día de superovulación (día 13) cada una de las vaquillas recibió dos inyecciones de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , al mismo tiempo de recibir las inyecciones de FSH. Lo anterior permitió la sincronización estral de las vaquillas durante el proceso de superovulación.<sup>25,52</sup>

Para facilitar la detección de celos se marcó el maslo de la cola de todas las vaquillas y se repintaron los números de identificación en los costados para el día 14 iniciar con la detección de celos.<sup>60</sup> La detección de celos se realizó por observación visual durante 15 minutos con intervalos de tiempo de una hora entre cada una de las observaciones por un período de tiempo de 60 horas continuas, tiempo considerado como límite a una respuesta positiva a la sincronización.<sup>6,20,60,97</sup> Durante todo este periodo las vaquillas estuvieron durante la mañana en el potrero y durante la noche pasaron a un corral de encierro para tener un mayor control. Junto con las vaquillas estuvieron dos machos celadores y dos vaqueros que ayudaron en la detección de los celos. Estableciendo que una vaquilla estaba en celo cuando se quedaba completamente quieta y se dejaba montar sin oponer resistencia,<sup>6,60</sup> registrando en ese momento el número de la vaca pintado en los costados, la fecha y hora de la presentación del celo, datos que posteriormente eran vaciados a un formato especialmente diseñado para el caso.

Una vez establecido el momento del celo se procedió a inseminar a las vaquillas 12, 24 y 36 horas después. Las dosis de semen, envasadas en pajillas de 0.5 ml fueron de toros probados con alta fertilidad de la raza Brahman. Las pajillas con semen se descongelaron en agua tibia a 37° C durante 30 segundos y una muestra se observó al microscopio para verificar la viabilidad espermática. Todas las inseminaciones se realizaron siempre por el mismo médico veterinario, utilizando en los aplicadores protectores plásticos (chemisse sanitario) los cuales se rompieron a la entrada del cérvix para evitar infecciones posteriores. Las vaquillas fueron inseminadas de la siguiente manera: a las 12 horas una dosis, a las 24 horas dos dosis y una dosis mas a las 36 horas, posteriores al establecimiento del celo (día 15 y 16).<sup>6,18,62,55,75</sup>

Después de 6.5 días, con respecto a la primera inseminación, se procedió a la recuperación de los embriones, respetando el orden en que las vaquillas

presentaron el estro. La colección fue en todos los casos realizada siempre por el mismo médico veterinario, por medio de la técnica cerrada o no quirúrgica para colección de embriones.<sup>38,88,91</sup>

El procedimiento no quirúrgico para colecta embrionaria consiste en la introducción vaginal de una sonda Folley de dos vías calibre No. 14, para el caso de vaquillas, hasta la entrada del cuerno uterino, el cual se lavó 5 veces con un total de 500 ml de medio para colecta embrionaria Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS Gibco® BRL). El medio de lavado pasa por un filtro Em-Con (Immuno Systems, Inc.), equipo donde se depositan los embriones.<sup>91</sup>

Después de terminar la colecta de embriones en uno de los cuernos uterinos, se retiró la sonda Folley, realizando el mismo procedimiento en el cuerno contrario utilizando una nueva sonda.<sup>91</sup>

Una vez finalizado el procedimiento de colección embrionaria, se llevó el equipo completo al laboratorio, donde el embriólogo procedió a pasar el líquido del filtro Em-Con a una caja de Petri, realizando 3 lavados de enjuague al filtro, procediendo a la observación y clasificación de las estructuras obtenidas (óvulos-embriones).<sup>23,31,39,55,91</sup>

Los óvulos-embriones se observaron al microscopio estereoscópico clasificándolos de acuerdo a su etapa embrionaria en: mórulas, blastocitos iniciales, blastocitos maduros y blastocitos expandidos, cada uno de los cuales tuvieron una calidad valorada como: 1: excelente; 2: bueno; 3: regular, 4: malo. Los datos se anotaron en un formato especialmente diseñado para el trabajo experimental.<sup>62,69,71,91</sup>

### 3.4 Segundo Periodo Experimental (Otoño).

El segundo periodo del trabajo se realizó 60 días después de finalizar el primer periodo, durante el mes de noviembre. El procedimiento fue exactamente el mismo al de la primera fase del trabajo de investigación, donde las vaquillas fueron sincronizadas inicialmente con la aplicación de dos inyecciones de PGF<sub>2α</sub>, con un intervalo de 12 días entre aplicaciones y dosis individual de 37.5 mg.

En el segundo periodo se invirtieron los grupos, con respecto al primero ya que el grupo que durante el primer periodo no recibió el tratamiento con bST, en el

segundo periodo recibió el tratamiento de 500 mg de bST al aplicarles una inyección subcutánea de Lactotropina® en el pliegue ano-caudal a cada uno de los animales del grupo (día 4).

Las vaquillas se superovularon con una dosis total de 250 mg de NIH-FSH-P1, sincronizadas con dos aplicaciones de PGF<sub>2α</sub> en el penúltimo día de superovulación (día 13).

La detección de estros se realizó de la misma forma que en el primer periodo. La inseminación de los animales la llevó a cabo el mismo médico veterinario utilizando semen del mismo lote que se utilizó en el primer periodo.

La técnica de colección, el técnico especializado que la realizó y el embriólogo que clasificó los óvulos-embiones fueron los mismos para el segundo periodo.

Así, el trabajo fue realizado en dos temporadas estacionales diferentes: Verano y Otoño.

### 3.5 Análisis Estadístico

Una vez obtenidos los resultados de los dos periodos, los datos correspondientes a embriones colectados y clasificación de los embriones, en cuanto a sus características morfológicas y de desarrollo, fueron transformados a  $\sqrt{y+0.5}$  y posteriormente analizados con el procedimiento para modelos lineales del SAS, incluyendo: tratamiento, periodo y animal.

Siendo el modelo matemático el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + P_k + e_{ijk}$$

Donde:  $\mu$  = media poblacional

$C_i$  = efecto de vaca

$T_j$  = efecto de tratamiento

$P_k$  = efecto de periodo

$e_{ijk}$  = error residual

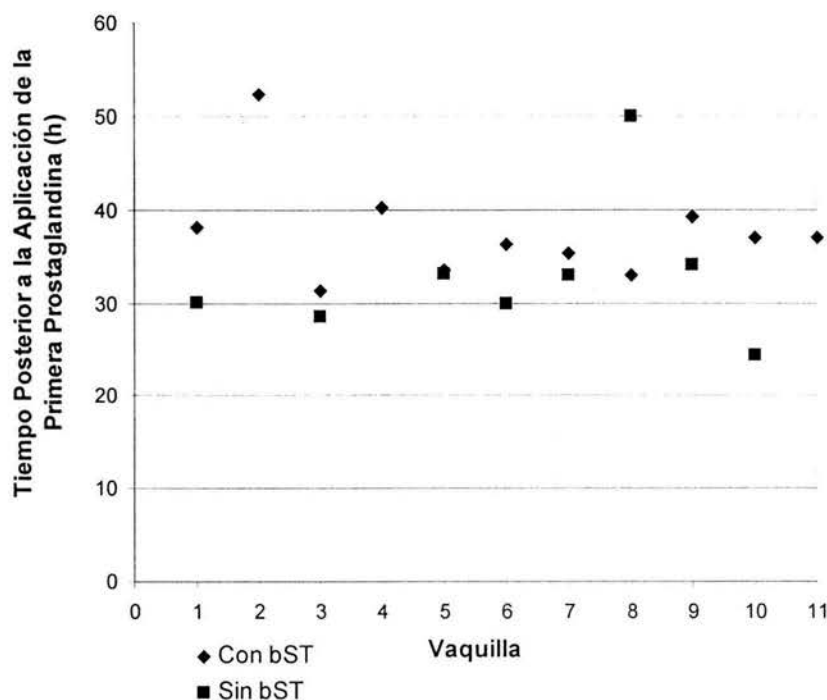
## 4. RESULTADOS.

### 4.1 Respuesta a la Sincronización Durante la Etapa de Superovulación.

Los datos de una de las vaquillas solo se consideran en la respuesta a la sincronización durante el primer periodo ya que ésta presentó, al tratar de inseminarla, el cérvix cerrado por lo que no se pudo inseminar, quedando fuera del trabajo debido a esta condición.

Se consideró que una vaquilla presentaba respuesta positiva a la sincronización estral cuando manifestaba el celo en un lapso de 60 horas (h) como máximo, posterior a la primera aplicación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dentro del programa de superovulación (Cuadro 1).

Gráfica 1. Presentación de Celos, Posterior a la Aplicación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en Vaquillas Brahman Superovuladas en el Verano.

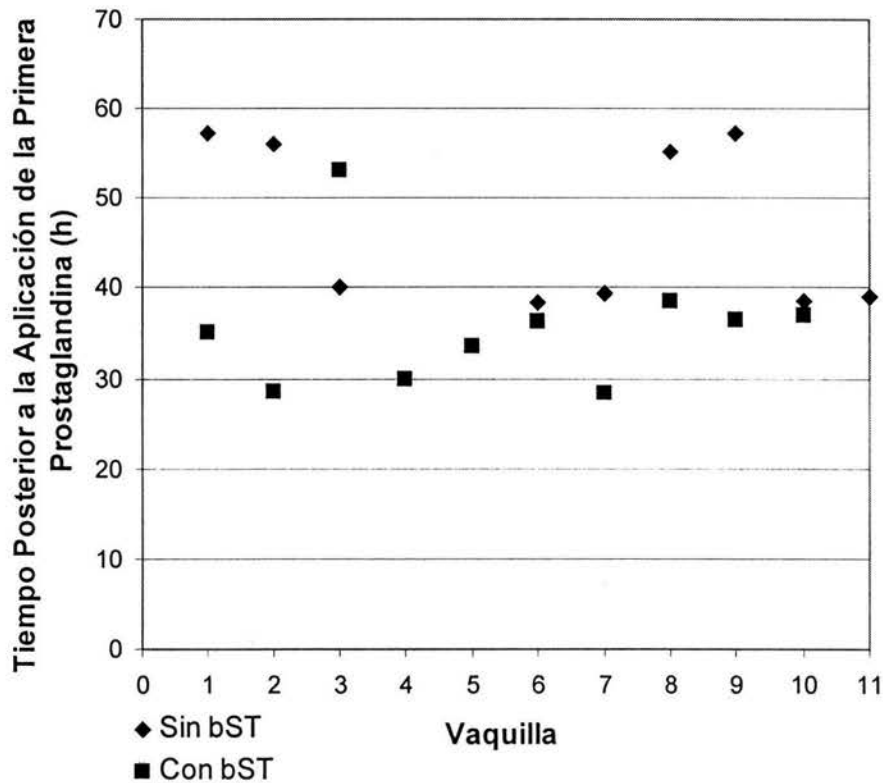


En la gráfica 1 se observa la respuesta a la sincronización en los dos grupos (con y sin bST) durante el Verano. La mayor parte de las vaquillas presentan celos entre las 30 y 40 horas (h), posteriores a la aplicación de  $PGF_{2\alpha}$ , independientemente del tratamiento con bST.

En el caso de las vaquillas del grupo tratado con bST, todas presentan celo (100%) y responden de manera mas uniforme en comparación con las no tratadas pues solo una es la vaquilla que presenta celo fuera del rango de 30 a 40 h.

En el grupo que no recibió bST, 8 de las 11 vaquillas presentan celo, lo cual corresponde al 72.7% de efectividad a la aplicación de  $PGF_{2\alpha}$ . La dispersión en este grupo es mayor en comparación con el grupo tratado con bST ya que 5 de las 8 vaquillas presentan celo entre 30-40 h posterior a la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$  2 vaquillas están por debajo del rango y una vaquilla presentó el calor por arriba del rango promedio de 30-40 h donde la mayoría de las vaquillas presentaron celo.

Gráfica 2. Presentación de Celos, Posterior a la Aplicación de  $PGF_{2\alpha}$  en Vaquillas Brahman Superovuladas en el Otoño.



La gráfica 2 muestra la presentación de celos en las vaquillas trabajadas en el periodo 2 después de la aplicación de  $PGF_{2\alpha}$  durante la etapa de superovulación. De las vaquillas del grupo tratado con bST, las cuales fueron 10, todas presentaron celo, de manera que se considera un 100% de efectividad en la respuesta a la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$  durante la superovulación. La mayor parte de los animales del grupo tratado con la bST (7) presentaron celo en un rango promedio de tiempo que va de 30 a 40 h posterior a la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$ . Dos vaquillas presentaron celo muy cerca de las 30 h posterior a la  $PGF_{2\alpha}$  quedando por abajo del rango promedio de tiempo y una vaquilla más dentro del rango de 50 a 60 h posteriores a la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$ .



La eficiencia en la respuesta a la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$  para el grupo de vaquillas que no recibió la bST fue del 81.8% ya que dos vaquillas no presentaron conducta estral. De los 9 animales que respondieron positivamente a la sincronización, 5 presentaron el celo dentro del rango de las 30-40 h posteriores a la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$ . Mientras que 4 de las 9 vaquillas que respondieron después de la  $PGF_{2\alpha}$  lo hicieron en el rango de las 50-60 h.

El tiempo promedio de respuesta para las vaquillas tratadas con bST en las dos épocas del año fue de 25.1 h posteriores a la aplicación de la  $PGF_{2\alpha}$ , mientras que en el caso del grupo control donde las vaquillas no recibieron bST, el tiempo promedio de respuesta posterior a la  $PGF_{2\alpha}$ , fue de 44.2 h ( $P=0.0001$ ).

Con respecto al periodo, se observa su efecto en la sincronización al presentarse el celo en las vaquillas, sin considerar el tratamiento con bST, en un tiempo promedio de 38.4 h durante el verano (periodo 1) y de 30.9 h en el periodo 2, correspondiente a la época de otoño ( $P=0.0243$ ). Así, puede notarse el efecto que tiene el periodo en las vaquillas, después de recibir  $PGF_{2\alpha}$  dentro de la etapa de superovulación ya que éstas respondieron mejor en el otoño en comparación con las de verano.

Cuadro 2. Respuesta a la Sincronización con PGF<sub>2α</sub> en la Etapa de Superovulación en Vaquillas Brahman con o sin Tratamiento de bST Durante Dos Épocas del Año

	Tratamiento			Periodo		
	Con bST	Sin bST	P=	V <sup>1</sup>	O <sup>2</sup>	P=
Tiempo Promedio de Respuesta Posterior a la PGF <sub>2α</sub> (h)	25.1	44.2	0.0001	38.4	30.9	0.0243

<sup>1</sup>Verano      <sup>2</sup>Otoño

#### 4.2 Recuperación de Estructuras y Embriones Totales.

##### 4.2.1 Cantidad de Óvulos y Embriones Colectados Durante el Verano.

Durante la época de Verano, del grupo tratado con bST se colectaron un total de 103 estructuras (óvulos/embriones), de las cuales 40 fueron óvulos y 73 embriones, siendo dentro de estos últimos 59 los embriones transferibles.

En el mismo periodo, pero en el caso del grupo sin bST, la colección fue de 38 embriones, de los cuales 26 fueron transferibles. De manera que, la cantidad de estructuras totales y en particular la de embriones transferibles fue mayor en el grupo tratado que en el grupo testigo (Cuadro 3)

##### 4.2.2 Cantidad de Óvulos y Embriones Colectados Durante el Otoño.

En el Otoño, los resultados fueron similares para ambos grupos volviéndose a observar un mayor número de estructuras colectadas en el grupo tratado con bST con un total de 92, de las cuales 27 fueron óvulos y 65 embriones de los cuales 50 fueron embriones transferibles.

En la misma época, pero en el caso del grupo de vaquillas que no recibieron bST el número de estructuras colectadas fue de 46 en total. Los óvulos colectados fueron 11 y los 35 embriones obtenidos de la colección fueron transferibles (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cantidad de óvulos/embriones Colectados en Vaquillas Brahman Superovuladas en Dos Épocas del Año.

Estructuras Obtenidas	Verano		Otoño	
	Con bST	Sin bST	Con bST	Sin bST
Óvulos	40	0	27	11
Embriones Totales	73	38	65	35
Embriones Transferibles	59	26	50	35

#### 4.2.3 Embriones Transferibles Promedio.

Los resultados obtenidos, fueron transformados a  $\sqrt{y+0.5}$  y analizados por medio del procedimiento para modelos lineales del SAS. Así, los datos obtenidos durante los dos épocas del año muestran que el promedio de embriones transferibles por vaquilla tratada con bST es de 4.9 (P=0.004). Mientras que para el grupo control, el cual no recibió el tratamiento de bST fue de 2.1 embriones promedio por vaquilla (P=0.004).

Dentro de los embriones transferibles promedio, no se encontró diferencia significativa en cuanto a la cantidad promedio de mórulas colectadas por vaquilla al ser ésta similar para ambos grupos con 1.1 para el grupo tratado con bST y 1.2 para el grupo testigo (P=0.828).

Sin embargo, con lo que respecta a los blastocitos, de las vaquillas tratadas con bST se obtuvo un promedio de 3.9 blastocitos por vaquilla, mientras que, para el grupo de vaquillas no tratadas el número promedio de blastocitos por vaquilla fue de 0.9, lo cual puede ser observado en el cuadro 4.

Cuadro 4. Embriones Transferibles Promedio por Vaquilla Obtenidos Como Respuesta al Tratamiento con bST en Vaquillas Brahman Superovuladas en Dos Épocas del Año.

Estructuras	Tratamiento			Periodo		
	Con bST	Sin bST	P=	V <sup>1</sup>	O <sup>2</sup>	P=
Mórulas	1.1	1.2	0.828	1.4	0.9	0.351
Blastocitos	3.9	0.9	0.004	2.4	2.3	0.92
Embriones Totales	4.9	2.1	0.004	3.9	3.2	0.450

<sup>1</sup>Verano    <sup>2</sup>Otoño

La cantidad de embriones transferibles promedio por vaquilla no se ve afectada significativamente por efecto del periodo en que se realizó el trabajo (cuadro 4).

#### 4.2.4 Blastocitos Transferibles.

Considerando que el grupo tratado con bST presenta un mayor número de embriones, en comparación con el grupo testigo, se observa que del total de embriones transferibles, el 79% son blastocitos como efecto del tratamiento (P=0.015). Este efecto no se observa en el grupo testigo donde el 32.4% son blastocitos.

El incremento en el porcentaje de blastocitos como efecto de la adición de bST al grupo tratado hace que el grupo testigo presente diferencias significativas en el promedio de mórulas en éste grupo al presentar el 67.6% de mórulas comparado con el 21% para el grupo tratado, por lo que se observa una disminución en el porcentaje de mórulas en las vaquillas que reciben un tratamiento con bST previo a la superovulación, con respecto a las vaquillas que no reciben el tratamiento.

Cuadro 5. Efecto de la Adición de Somatotropina Bovina (bST) en el Porcentaje de Blastocitos Obtenidos en Vaquillas Superovuladas en Dos Épocas del Año.

Estructuras	Tratamiento			Periodo		
	Con bST	Sin bST	P=	V <sup>1</sup>	O <sup>2</sup>	P=
Mórulas (%)	21.0	67.6	0.015	47.2	41.2	0.702
Blastocitos (%)	79.0	32.4	0.015	52.7	58.7	0.702

<sup>1</sup>Verano      <sup>2</sup>Otoño

El incremento en el porcentaje de blastocitos en las vaquillas tratadas con bST no se debe a la época del año en que se realice el trabajo (P=0.702), como se puede observar en el cuadro 5.

## 5. DISCUSIÓN.

### 5.1 Respuesta a la Sincronización.

La respuesta a la sincronización durante la fase de superovulación en las vaquillas Brahman utilizadas en el trabajo presentó una efectividad del 72% y hasta el 100% para el grupo sin somatotropina y el grupo que recibió el tratamiento con bST, respectivamente. Los resultados varían con respecto a los realizados por Molina (2000) en vacas Brahman bajo condiciones de trópico húmedo en Veracruz, México donde la efectividad es de 81 a 82% Mientras que en Canadá, Adams reportó en 1994 una efectividad del 91 al 92% en la respuesta a la sincronización estral utilizando  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Sin embargo, son muchos los trabajos realizados en cuanto a respuesta a la sincronización de forma tal que los resultados van desde el 52% (Bolaños *et al.* 1997), 70% en el trabajo de Orihuela en 1990 trabajando con ganado cebú. Por lo que los resultados de este trabajo coinciden con la revisión de literatura acerca de sincronización estral llevada a cabo por Odde (1990), donde reporta que la respuesta a sincronización oscila entre el 75 y 100%, datos muy cercanos a lo encontrado en el presente trabajo (72 a 100%).

Con respecto al intervalo de tiempo después del cual las vaquillas presentaron una conducta estral franca se observa que este oscila entre las 32 y 46 horas posteriores a la administración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  durante la etapa de superovulación en los animales utilizados en este trabajo. Estos resultados varían de acuerdo a lo reportado por Molina (2000) donde las vacas presentaron conducta estral 25 horas después de la administración de la prostaglandina durante la época de secas en el trópico mexicano y de 42 horas después cuando el trabajo fue realizado en la época de lluvias. Sin embargo, Rowson, 1994 reporta que la respuesta a la sincronización puede tener rangos que oscilan entre las 12 y hasta las 56 horas posteriores a la administración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Para el caso de las vaquillas utilizadas en este trabajo, puede observarse que la mayoría de ellas presenta una respuesta estral alrededor de 30 y 40 horas posteriores a la aplicación de la PGF<sub>2α</sub> (Gráficas 1 y 2), lo cual puede ser considerado como normal de acuerdo a lo reportado por Rowson y también a lo reportado por Molina (2000).

## 5.2 Recuperación de Estructuras.

Durante la primera fase del trabajo experimental, realizado en la época de Verano, las vaquillas produjeron un total de 103 estructuras, lo cual promedia 9.36 estructuras para los animales tratados con bST, mientras que el grupo que no recibió el tratamiento produjo 38 estructuras en total, con un promedio de 3.45 estructuras totales por vaquilla. Durante la época de Otoño, segunda fase del trabajo experimental, los promedios fueron de 8.36 estructuras promedio para el grupo con bST y de 4.18 para el lote testigo. Los resultados difieren de acuerdo a otros trabajos realizados, donde no se encontraron diferencias entre los grupos tratados con bST y los no tratados. Así, Herrel *et al.* (1990) no encuentra diferencias al trabajar con 30 vacas Holstein. Lo mismo ocurre con el trabajo de Rieger *et al.* 1991) que al trabajar con vacas durante la época seca y lluvias, sin encontrar diferencias significativas. Trabajo similar al realizado por Molina (2000), quien no encuentra diferencias significativas entre los grupos que reciben y no reciben el tratamiento con bST en dos épocas del año, trabajando con vacas Brahman. Sin embargo, son más los trabajos que coinciden en que si existen diferencias significativas entre las vacas que reciben un tratamiento con bST, donde el incremento en la cantidad de estructuras colectadas es superior al del grupo testigo (sin bST), tal es el caso del trabajo de Gong *et al.* (1993) quienes al adicionar 320 mg de bST obtienen resultados de 7.4 estructuras vs. 3.8 en el grupo testigo. Shea *et al.* (1984) menciona un promedio de 5.97 estructuras promedio sin diferencia significativa en cuanto a la época del año en que se realiza el trabajo.

Freitas *et al.*, (1997) en Brasil realiza 112 lavados en ganado Gyr, obteniendo 983 estructuras totales, con una tasa promedio de 8.7 estructuras totales por lavado.

Este es uno de los trabajos mas cercanos al realizado, sin embargo el promedio en este experimento es superior al obtener 9.36 estructuras totales promedio, además de ser estas vaquillas no seleccionadas, mientras que en el caso del trabajo de Freitas eran vacas seleccionadas exclusivamente como donadoras de embriones. Otros trabajos llevados a cabo en ganado cebú son los realizados por Carvalho *et al.* (1996) en Brasil reportando 7.8 estructuras totales promedio.

Los trabajos mencionados anteriormente no solo difieren en cuanto a las diferencias significativas en la cantidad de estructuras obtenidas, sino también en las razas trabajadas y sobre todo en el tipo de animales, donde todos utilizan vacas, mientras que en este trabajo siempre fueron vaquillas de la raza Brahman.

### 5.3 Embriones Transferibles.

Al no encontrar diferencias significativas con respecto a la época del año, lo cual coincide con el trabajo de Gong *et al.* en el año 1993 quien no encuentra diferencias entre el año y mes de lavado; se procedió a realizar el análisis global de los resultados, obteniendo un promedio de 4.95 embriones viables promedio para el grupo tratado con bST y de 2.09 embriones viables promedio para el grupo testigo, sin somatotropina.

Los trabajos de otros autores muestran diferencias con respecto a este así, Carvalho *et al.* (1996) reporta 6.3 embriones transferibles promedio y Freitas *et al.* (1997) 3.3 embriones transferibles en promedio. Sin embargo, algunos otros autores no muestran diferencias significativas en sus trabajos, tal es el caso de Herrel *et al.* (1990); Rieger *et al.* (1991) y Molina (2000).

Son diferentes los autores que demuestran el efecto positivo de la somatotropina bovina al ser incluida como adyuvante en los trabajos de superovulación, sin embargo en algunos se ve influencia de la época del año, como en el caso de los trabajos de Bastidas y Randel (1987) donde en un total de 1841 lavados reportan que las vacas sí se ven influenciadas por la estación del año y el mes de la estación al analizar 7 años de trabajo, mientras que en este trabajo debido al número de lavados y el análisis de dos épocas en el mismo año, los resultados difieren pues en este caso no se observó influencia de la época del año.



Variaciones en cuanto a las dosis de bST utilizadas también son diferentes entre los trabajos consultados ya que utilizan 640 mg en el caso de Herrel *et al.* (1990) utilizando PMSG para superovular o bien Rieger *et al.* (1991) quienes administran 160 mg de bST y superovulan con Folltropin, hormona utilizada en este trabajo pero diferente dosis de bST ya que para el experimento se utilizaron 500 mg y donde si se encontraron diferencias significativas al utilizar la bST, mientras que los otros autores no las encontraron.

Las observaciones en los resultados del incremento en el porcentaje de estructuras más avanzadas en su desarrollo es un resultado interesante en este trabajo. Así, el porcentaje de blastocitos es del 74.11% y el resto, 25.89% son mórulas para el caso del grupo tratado con la bST, mientras que el grupo testigo mantiene una relación considerada como normal con el 56.65% y 41.35% de mórulas y blastocitos, respectivamente. No se sabe con exactitud si esto mismo ocurre en los trabajos de los investigadores que han trabajado con bST en programas de superovulación, ya que todos hablan de estructuras totales y embriones viables sin hacer una diferenciación en cuanto al tipo de embriones. Sin embargo se puede relacionar con los trabajos de Lucy *et al.* (1992) en cuanto a dinámica folicular quien menciona la influencia de la bST incrementando la población de folículos en el ovario al igual que Gong *et al.* (1991). Aunque no se conocen con exactitud todos los mecanismos involucrados que llevan a madurar los folículos de 2-5 mm de diámetro, que son los que muestran incremento junto con los niveles de IGF-I, somatotropina e insulina o la regulación de la función ovárica influenciada por la relación entre las hormonas anteriormente citadas con la FSH y la LH (Poretsky & Kalin, 1997). Puede ser que la aplicación de bST en el proceso de superovulación actúa rescatando un mayor número de folículos al mismo tiempo, resultando en una ovulación anticipada o mejores condiciones uterinas, manifestado como embriones en etapas más avanzadas en su evolución.

## 6. CONCLUSIONES.

La somatotropina bovina (bST) como coadyuvante en la superovulación de vaquillas cebuínas de la raza Brahman incrementa el número de embriones colectados, principalmente blastocitos, sin importar la época del año.

La adición de bST previo al tratamiento superovulatorio no solo incrementa la cantidad de estructuras obtenidas (óvulos/embriones), sino también sincroniza de manera mas uniforme la presentación de estros en aquellas vaquillas que recibieron la bST, en comparación con las que carecieron del tratamiento.

El efecto de periodo en cuanto a la respuesta a sincronización, puede ser observado al presentar una mejor sincronización estral en las vaquillas superovuladas durante la época de Otoño en comparación con las vaquillas tratadas en el Verano.

La adición de bST en vaquillas superovuladas de la raza Brahman incrementa el promedio de estructuras totales (10.75) y embriones transferibles promedio (4.9) comparadas con las que no reciben el tratamiento, que es de 5.9 estructuras totales promedio y 2.1 embriones transferibles promedio por vaquilla.

Los embriones transferibles, al ser analizados en porcentaje, se observa un incremento en los blastocitos obtenidos: 79%. Mientras que el de vaquillas que no reciben bST es del 32.4%.

Con respecto al tipo de embriones transferibles, se puede observar que los obtenidos de las vaquillas tratadas con la bST maduran más rápidamente. De ahí, que el porcentaje de blastocitos es mayor para el grupo tratado (79%), mientras que en el grupo sin somatotropina se encuentra dentro de los estándares comúnmente encontrados (32.4%).

Las vaquillas tratadas con bST producen una mayor cantidad de embriones viables en comparación con ellas mismas al no recibir la somatotropina bovina, lo cual no pudiera ser considerado como un efecto residual a la aplicación de la bST durante el primer periodo, ya que la respuesta claramente muestra una respuesta similar en ambos periodos , sin considerar los datos de los óvulos obtenidos.

No existe evidencia estadística para demostrar que la época del año tiene efecto en la superovulación de vaquillas Brahman al recibir somatotropina bovina.

## 7. LITERATURA CITADA.

1. Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Can J Anim Sci* 1993;73:267-275.
2. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992;94:177-188.
3. Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology* 1994;41:19-24.
4. Bo GA, Adams GP, Nasser LF, Pierson RA, Mapletoft RJ. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology* 1993;40:225-239.
5. Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Caccia M, Tributo H, Mapletoft RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17 $\beta$  treatment of heifers with or without a progestagen implant. *Theriogenology* 1994;41:1555-1569.
6. Bo GA, Adams GA, Mapletoft RJ. Sincronización de celos para programas de inseminación artificial y transferencia de embriones bovinos. Simposio sobre control farmacológico del ciclo estral en rumiantes. Brasil (San Pablo): Universidad de San Pablo, 2001:35-60.
7. Bolaños JM, Galina CS, Estrada S, Forsberg M. Effect of temporary weaning and progestagen treatment in the advancement of ovarian activity in anestrus zebu cattle. *Reproduction of Domestic Animals* 1997; 32:267-272.
8. Braw-Tal L, Yossefi S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicular growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1977;109:165-171.
9. Briggs HM. Razas modernas de animales domésticos. 5ª ed. España:Acribia, 1991.
10. Broadpent PJ, Dolman DF, Watt RG, Smith AK, Franklin MF. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulation response in cattle. *Theriogenology* 1997;47:1027-1040.
11. Brogliatti GM, Salamone DF, Adams GP. Ovarian follicular wave synchronization and superstimulation in prepubertal calves. *Theriogenology* 1997;47:1253-1264.

12. Bungartz L, Neimann H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil* 1994;101:583-591.
13. Cahill LP, Mauleon P. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *J Reprod Fertil* 1981;61:201-206.
14. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil* 1995;49:335-350.
15. Carvalho JB, Alvarez RH, Miguel O. Efeito do "priming" com FSH na resposta ovariana de vacas superovuladas. Faculdade de Veterinaria UFRGS. Porto Alegre, Brazil. 1996;24:202.
16. Chalupa W, Baird L. Responses of dairy cows to somatotropin. *J Dairy Sci* 1987; 70:176-185.
17. Cole WJ, Madsen KS, Hintz RL, Collier RJ. Effect of recombinantly-derived bovine somatotropin on reproductive performance of dairy cattle. *Theriogenology* 1991;36:573-595.
18. D'Occhio MJ, Jillella D, 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.
19. De la Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. Effects of recombinant somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1993;76:1002-1013.
20. De la Sota RL, Risco C, Moreira F, Thatcher WW. Efficacy of timed insemination programs in lactating dairy cows during summer heat stress. *Theriogenology* 1998;49:761-772.
21. De la Sota RL, Simmen FA, Díaz T, Thatcher WW. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol Reprod* 1996;55:803-812.
22. Dobson H. Plasma gonadotrophins and oestradiol during Oestrus in the cow. *J Reprod Fertil* 1978;52:51-53.
23. Donaldson LE. Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. *Theriogenology* 1983; 20:163-168.

24. Donaldson LE. The day of the estrous cycle the FSH is started and superovulation in cattle. *Theriogenology* 1984;22:97-99.
25. Donaldson LE. The effect of prostaglandin F<sub>2α</sub> treatments in superovulated cattle on estrus response and embryo production. *Theriogenology* 1983;20:279-285.
26. Erickson GF, Nakatani A, Ling N, Shimasaki S. Localization of insulin-like growth factor-binding protein-5 messenger RNA in rat ovaries during the estrous cycle. *Endocrinology* 1992;130:1867-1878.
27. Findlay JK. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 1993;48:15-23.
28. Fortune JE. Ovarian follicular growth in mammals. *Biol Reprod* 1994;50:225-232.
29. Freitas C, Ferreira AM, Sa WF, Camargo LSA, Junqueira MM. desempenho de vacas Gyr na resposta superovulatoria em produção de embriões. Arquivos da Faculdade de Veterinaria UFRGS. Porto Alegre, Brazil. 1997.
30. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4ª ed. México:Larios, 1988.
31. García-Bojalil CM, Staples CR, Thatcher WW. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1994;77:2537-2548.
32. García-Bojalil CM. Suplementación mineral. Memorias del Curso Internacional Avanzado de Nutrición de Rumiantes; 1996 octubre 23-25; Universidad Autónoma Metropolitana: Xochimilco, México. México (DF): Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal, AC, 1996:1-14.
33. Ginther OJ, Wiltbank MR, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1996;55:1187-1194.
34. Gong JC, Bramley TA, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fertil* 1993;97:247-254.
35. Gong JG, Bramley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular population and peripheral hormones. *Biology of Reproduction* 1991;45:941-949.

36. Gong JG, Bramley TA, Wilmut I, Webb R. Effect of recombinant somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biology of Reproduction* 1993;48:1141-1149.
37. Gong JG, McBride D, Bramley TA. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells *in vitro*. *Journal of Endocrinology* 1993;139:67-75.
38. Gong JG, Wilmut I, Bramley TA, Webb R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 1996;45:611-622.
39. Gonzáles A. Superovulation in beef heifers with Folltropin. A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 1990;33: 519-529.
40. Grimes RW, Barber JA, Shimasaki S, Ling N, Hammond JM. Porcine ovarian granulosa cells secrete insulin-like growth factor-binding proteins-4 and 5 and express their messenger ribonucleic acids: regulation by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. *Biol reprod* 1994;50:695-701.
41. Guibault LA, Grasso F, Lussier JG, Rouillier P, Matton P. Decreased superovulatory responses in heifers superovulation in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 1991;91:81-89.
42. Guidice LC, Chandrasekar YA, Cataldo NA. The potential roles of ovarian peptides in normal and abnormal mechanisms of reproductive physiology. *Biol Reprod* 1993;5:350-359.
43. Gustafson H. Characteristics of embryos from repeat breeder and virgin heifers. *Theriogenology* 1985;23:487-498.
44. Hafez ESE, Hafez B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ª ed. México:McGraw-Hill, 2000.
45. Hay MF, Moor RM, Cran DG, Dott HM. Regeneration of atretic sheep follicles *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1979;55:195-207.
46. Herrel A, Farries E, Niemann H. A trial to stimulate insulin like growth factor 1. Levels to improve superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 1990;33:248-254.

47. Herrier A, Einspanier R, Schams D, Niemann H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 1994;41:601-611.
48. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Inter Rev Cyt* 1991;124:43-58.
49. Hsu SY, Kubo M, Chun SY, Haluska FG, Housman DE, Hseuh AJW. Wilm's tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor decreases expression during follicle development and repression of inhibin promoter. *Endocrinology* 1995;9:1356-1366.
50. Hutcheson DP. Nutrient requirements of transit-stress syndrome in cattle nutrition. Nutritional and environmental effects. *J Anim Sci* 1988;62:555-561.
51. Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, McNatty KP. Apoptosis of bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle stimulating hormone and luteinizing hormone and follicular atresia. *Biol Reprod* 1994;51:934-944.
52. Kastelic JP, Knopf L, Ginther OJ. Effect of day of prostaglandin F<sub>2α</sub> treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim Reprod Sci* 1990;23:169-180.
53. Ko JCH, Kastelic JP, Del Campo MR, Ginther OJ. Effects of the dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil* 1991;91:511-519.
54. Kohram H, Bousquet D, Durocher J, Guibault LA. Follicular status and superovulation in cattle: a field trial. *Theriogenology* 1995;43:252-264
55. Lerner SP, Thayne WV. Age, dose and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J Anim Sci* 1986;63:176-183.
56. Lucy MC, Collier RJ, Kitchell ML, Dibner JJ, Hauser SD, Krivi GG. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biology of Reproduction* 1993;48:1219-1227.
57. Lucy MC, Savio JD, Bandinga L, De la Sota RL, Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 1992;70: 3615-3626.

58. Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1987;81:301-307.
59. Macmillan KL, Burke CR. Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 1996;42:307-320.
60. Mapletoft RJ, Martínez MF, Adams GP, Kastelic J, Burnley CA. The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. *Theriogenology* 1999;47:411-423.
61. Macmillan KL, Taufa VK, Barnes DR, Day AM, Henry R. Detecting estrus in synchronized heifers using tailpaint and an aerosol raddle. *Theriogenology* 1988;30:1099-1114.
62. Manova K, Huang EJ, Angeles M, De León V, Sánchez S, Pronovost SM, *et al.* The expression pattern of c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Biol Reprod* 1993;157:85-89.
63. Mapletoft RJ, Bo GA, Adams GP. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrous cycles in bovine embryo transfer programs. *Anim Reprod Sci* 2000;28:23-48.
64. Marion GB, Gier HT, Choudhary JB. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *J Anim Sci* 1968;27:451-458.
65. Martínez BS, Sánchez AP, Anta J, Berruecos M, Valencia J. Valoración de dos hormonas folículo estimulantes comerciales usadas en la superovulación de vacas en lactación y vaquillas en ganado lechero. *Tec Pecu Mex* 1995;33:34-42.
66. Mauleon P, Mariana JC. Oogenesis and folliculogenesis. In: Cole HN, Cupps PT, editors. *Reproduction in domestic animals*. New York:Raven Press, 1977:175-198.
67. McClary D, McGuffey RK, Green HB. Bovine somatotropin. *Agr Pract* 1990;11(Pt 2):5-11.
68. McDaniel BT, Gallant DM, Feltrow J. Lactational, reproductive and health responses to recombinant bovine somatotropin under field conditions. *J Dairy Sci* 1989;72:429-438.



69. McDonald LE. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4<sup>a</sup> ed. México: Interamericana, 1991.
70. McNatty KP, Heath DA, Henderson KM, Lan S, Hurst PR, Ellis LM, Montgomery GW, Morrison L, Thurley DC. Some aspects of theca and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1984;72:39-53.
71. Molina EJ. Efecto de la adición 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). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
72. Monget P, Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J Reprod Fertil* 1995;49:321-333.
73. Monniaux D, Chupin D, Saumende J. Superovulatory responses in cattle. *Theriogenology* 1983;19:55-81.
74. Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clément F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil* 1997;76:45-56.
75. Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose M, Thatcher VWW. Use of bovine somatotropina in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000;83:1237-1246.
76. Murphy MG, Boland MP, Roche JF. The effects of dose and duration of administration of pFSH during the first follicular wave on the ovulation rate of beef heifers. *Theriogenology* 1998;49:557-569.
77. Murray AJ, Cavaleri JC, D'Occhio MJ, Whyte TR, McClellan LJ, Fitzpatrick LA. Treatment with progesterone and 17 $\beta$ -oestradiol to induce emergence of a newly-recruited dominant ovulatory follicle during oestrous synchronization with long-term use of norgestomet in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci* 1998;50:11-26.
78. Nasser LF, Adams GP, Bo GA, Mapletoft RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993;40:713-724.

79. Odde KG. A review of synchronization of oestrous in postpartum cattle. *J Anim Sci* 1990;68:817-830.
80. Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod* 1995;53:295-301.
81. Orihuela A, Galina CS, Duchateau A. The efficacy of oestrous detection and fertility following synchronization with PGF<sub>2α</sub> or Synchromate B in zebu cattle. *Theriogenology* 1989;32:745-753.
82. Packer AI, Hsu YC, Besmer P, Bachvarova RF. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev Bio* 1994;161:194-205.
83. Peluso JJ, Pappalardo A, Trolice MP. N-cadherin-mediated cell contact inhibits granulosa cell apoptosis in a progesterone dependent manner. *Endocrinology* 1995;137:1196-1203.
84. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 1984;21:495-504.
85. Richards JS. Maturation of ovarian follicles: Action and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physio Rev* 1980;60:51-89.
86. Rieger D, Walton JS, Goodwin ML, Johnson WH. The effect of co-treatment with bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 1991;35:863-868.
87. Roche JF. Control and regulation of folliculogenesis. A symposium in perspective. *Rev Rep* 1996;1:19-27.
88. Ryan DP, Spoon RA, Williams GL. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. *J Anim Sci* 1992;70:3505-3513.
89. Ryan RJ. Follicular atresia: some speculation of biochemical markers and mechanisms. In: Schwartz NB, Hunzicker-Dunn M, editors. *Dynamics of ovarian function*. New York:Raven Press, 1981:1-11.
90. Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 1988;83:663-671.

91. Seidel GE. Applications of embryo transfer and related technologies to cattle. *J Dairy Sci* 1984;67:2786-2796.
92. Shea BF. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology* 1981;24:202-218.
93. Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 1988;39:308-317.
94. Solon AE, Donald CL. Farm animal well-being: stress physiology, animal behavior, and environmental design. New Jersey:Prentice-Hall,1999.
95. Spicer LJ, Stewart RE. Interaction among bovine somatotropin, insulin and gonadotropins on steroid production by bovine granulosa and thecal cells. *J Dairy Sci* 1996;79:813-821.
96. Tepperman J. *Metabolic and Endocrine Physiology*. 4th ed. London:Medical Publishers,1981.
97. Tessman NJ, Radloff HD, Dhiman TR. Effect of dietary forage:grain ratio response of lactating dairy cows to recombinant bovine somatotropin. *J Dairy Sci* 1989;71:121-130.
98. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991;129:2799-2801.
99. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1996;1:162-172.
100. Turner D, Bagnara JT. *General Endocrinology*. 6<sup>th</sup> ed. London:Saunders,1976.
101. Van Cappelin WA, Meijs HM, Kramer P, Van den Dungen HM. Ovarian follicle dynamics in immature rats treated with luteinizing hormone releasing hormone antagonist. *Biol Reprod* 1989;23:1247-1256.
102. Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1988;71:1063-1076.
103. Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;55:942-948.
104. Webb R, Gong JG, Bramley TA. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology* 1994;41:25-30.

105. Weisen JF, Midgely AR. Expression of connexin 43 gap junction protein messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biol Reprod* 1994;50:336-348.
106. Yaakub H, Duffy P, O'Callaghan D, Boland MP. Effect of timing of oestradiol benzoate injection relative to gonadotropin treatment on superovulatory response, and on embryo yield and quality in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 1998;52:191-204.
107. Zhou J, Chin E, Bondy C. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* 1991;129:3281-3294.