



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**Evaluación de la adición de dos Proteínas Ligadoras de
Heparina al semen bovino congelado en la inseminación
artificial con dosis reducida.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

PAOLA MICHEL SANABRIA RAMOS

TUTOR

DR. SALVADOR ROMO GARCÍA

COMITÉ TUTORAL

DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ

Cuautitlán Izcalli, Edo. México

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS.

- ❖ Primero que todo, quiero dedicar este trabajo a Dios por haberme permitido vivir esta experiencia profesional.
- ❖ A mis padres, Gloria y Miguel, por siempre apoyarme y estar cuando los necesito, pero este trabajo especialmente se lo dedico a mi Mamá, quien además de acompañarme en esta aventura formó parte de este trabajo.
- ❖ A mi hermano Abraham, tía Jose y mi primo Uriel por su apoyo y compañía.
- ❖ A mis compañeros de Maestría por su apoyo, compañía y todos los momentos buenos y malos que vivimos juntos.

DIOS LOS BENDIGA.

AGRADECIMIENTOS.

- ❖ A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado a través de la beca durante mis estudios de posgrado.
- ❖ Al Programa de Apoyos de la Universidad de Texas A&M - Conacyt para la colaboración en investigación.
- ❖ A la compañía comercial Sexing Technologies por la donación del semen utilizado en este trabajo.
- ❖ Al Lic. Felipe Casanova Lastra por haberme permitido realizar este trabajo en el rancho La Racha en el estado de Tabasco y la ayuda prestada por sus trabajadores.
- ❖ Al Dr. Salvador Romo por su enseñanza, apoyo y por ser parte de mi formación en el posgrado.
- ❖ Al comité tutorial: Dr. José Alfredo Medrano Hernández y Dr. Fernando de la Torre Sánchez, por su apoyo y el tiempo que me brindaron para poder realizar este trabajo.
- ❖ Al jurado: Dra. Yvonne Ducolomb Ramírez, Dr. Mario Pérez Martínez, Dr. Armando Enrique Esperón Sumano, Dr. Héctor Jiménez Severiano, por brindarme su valioso tiempo en la revisión de este trabajo.
- ❖ A los Drs. Thomas H. Welsh Jr. y Ronald D. Randel, Profesores de la Universidad de Texas A&M, por el apoyo brindado para realizar este trabajo.
- ❖ Al Sr. Juan F. Moreno, Director de Sexing Technologies, por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.
- ❖ Al Dr. Michael E. Kjelland, por el apoyo brindado en la parte técnica y bibliográfica para poder elaborar este trabajo.
- ❖ Al Dr. José de Lucas Tron por sus consejos y asesoría
- ❖ Al Dr. Javier Hernández por apoyarme y alentarme a seguir estudiando y ser mejor cada día en mi profesión.

¡GRACIAS!

PRESENTACIÓN.

El presente trabajo forma parte del Proyecto Número 2009-004 del Programa de Apoyos de la Universidad de Texas A&M - Conacyt para la Colaboración en Investigación: Adaptation of Biotechnologies for Reproduction of Cattle in the Tropics (Adaptación de Biotecnologías para la Reproducción del Ganado en el Trópico). En esta investigación también se cuenta con el apoyo de la compañía comercial Sexing Technologies.

RESUMEN.

Nuevas investigaciones han descubierto proteínas que se producen en las glándulas sexuales accesorias del macho, las cuales se liberan en el líquido seminal durante la eyaculación y están implicadas en la fertilidad, facilitando la Capacitación Espermática y la Reacción Acrosomal, estas proteínas son llamadas Proteínas Ligadoras de Heparina (HBPs). Al detectarse HBPs como el Antígeno Asociado a la Fertilidad (FAA) y el Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2 (TIMP2) en la membrana de los espermatozoides se ha encontrado un aumento en la fertilidad de los toros de hasta un 40%. El objetivo de este estudio fue evaluar si los porcentajes de fertilidad en un programa de inseminación artificial en el trópico mejoran con la adición de FAA y TIMP-2 al semen bovino congelado en dosis reducida (10×10^6 de espermatozoides/pajilla). El estudio se realizó en un rancho ganadero comercial de tipo extensivo en pastoreo bajo condiciones de trópico húmedo mexicano. Se trabajaron 47 hembras de la raza Brahman y 51 de la raza Nelore, las cuales fueron sincronizadas con dispositivos intravaginales (DIVs con 1.9 g de Progesterona), Benzoato de Estradiol (2 mg) y Prostaglandina F2 alfa (500 μ g). Para la inseminación con semen congelado en dosis reducida se formaron dos grupos, el grupo HBP (n= 48 hembras) al que se adicionaron HBPs y el grupo testigo (n= 50 hembras), sin HBPs. Los resultados mostraron que en los dos grupos el porcentaje de retención de DIVs fue de 97.9%, el porcentaje de presentación de celos fue de 93.8% y el porcentaje de gestación fue de 12.5% para el grupo HBP y de 34% para el grupo testigo ($P < 0.05$). Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que la adición de las proteínas FAA y TIMP-2 al semen bovino congelado en dosis reducida no mejoró los porcentajes de gestación, y que es necesario realizar más investigación sobre estas proteínas y sobre los factores estresantes relacionados con el clima tropical que influyen en la fertilidad del ganado.

Palabras clave: Líquido seminal, Proteínas Ligadoras de Heparina, FAA, TIMP-2, Fertilidad, IA.

ABSTRACT.

New research has discovered proteins that occur in the male accessory sex glands, which are released into the seminal fluid during ejaculation and are involved in fertility, facilitating Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction, these proteins are known as Heparin-Binding Proteins (HBPs). Upon detection of HBPs as the Fertility Associated Antigen (FAA) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP-2) in the sperm membrane, an increase in bull fertility of up to 40% was found. The objective of this study was to evaluate whether fertility rates in artificial insemination program in the tropics improve with the addition of FAA and TIMP-2 to bovine frozen semen in a reduce dose (10×10^6 spermatozoa/straw). The study was conducted in a commercial cattle ranch of the extensive grazing type under mexican humid tropical conditions. They worked 47 females of the Brahman breed and 51 of the Nelore breed, which were synchronized with intravaginal devices (IVDs with 1.9 g Progesterone), Estradiol Benzoate (2 mg) and Prostaglandin F2 alpha (500 μ g). Two groups were used for the insemination using frozen semen in a reduced dose, the HBP group (n = 48 females) added with HBPs, and the control group (n = 50 females) without HBPs. The results showed that in both groups the IVD retention rate was 97.9%, the percentage of females showing heat was 93.8% and the pregnancy rate was 12.5% for the HBP group and 34% for the control (P <0.05). Based on the results obtained in this study it is concluded that the addition of proteins FAA and TIMP-2 to bovine semen frozen in a reduced dose did not improve pregnancy rates, and that further research is needed on these proteins and on the stressing factors associated with tropical climate which influence fertility in cattle.

Key Words: Seminal fluid, Heparin-Binding Proteins, FAA, TIMP-2, Fertility, AI.

INDICE.

	Página.
PRESENTACIÓN	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
<i>FACTORES QUE AFECTAN LA FERTILIDAD DEL</i>	
<i>GANADO <i>Bos indicus</i> EN EL TRÓPICO</i>	6
<i>PROTEÍNAS EN EL LÍQUIDO SEMINAL</i>	12



	Página.
<i>PROTEÍNAS LIGADORAS DE HEPARINA: Antígeno Asociado a la Fertilidad (FAA) e Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2 (TIMP-2)</i>	13
JUSTIFICACIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	46

LISTA DE CUADROS.

Cuadro	Página.
1 PORCENTAJES DE RETENCIÓN DE DIVs Y PRESENTACIÓN DE CELOS.....	31
2 PORCENTAJES DE GESTACIÓN OBSERVADOS.....	34
3 PORCENTAJES DE GESTACIÓN OBSERVADOS POR EDAD	35
4 PORCENTAJES DE GESTACIÓN OBSERVADOS POR RAZA	36
5 PORCENTAJES DE GESTACIÓN OBSERVADOS POR CONDICIÓN CORPORAL.....	37

LISTA DE FIGURAS.

Figura		Página.
1	Mecanismo de capacitación espermática mediado por proteínas BSP	16
2	Identificación de FAA por medio de SDS-PAGE	18
3	Identificación de TIMP-2 por medio de Coomassie y Western Blot	19
4	Protocolo para sincronizar la oleada folicular, el celo y la ovulación.....	26
5	Diagrama de Flujo Metodología.....	30
6	Presentación de celos por horas.....	32
7	Presentación de celos por edad de las hembras (horas).....	33

INTRODUCCIÓN.

En México la industria ganadera, en especial la producción de carne es una de las actividades productivas más importantes y que representa el ingreso de un gran número de familias en el medio rural, ya que de los casi 200 millones de hectáreas que componen al territorio mexicano, alrededor de 110 millones están dedicadas a la ganadería, y ésta se realiza en todos los tipos de climas y regiones ecológicas del país.¹

El ganado existente en el trópico es en general una mezcla de razas, siendo las de mayor influencia criollas y cruces de Cebú (Brahman, Indubrasil) con razas europeas (Holstein, Suizo). No obstante que el ganado es por excelencia productor de carne en pastoreo, se estima que por lo menos en el 40 % de los ranchos se obtiene leche como producto adicional.²

En el país, la producción de carne bovina representa un 30.3 % de la producción total de carnes, debido a la evolución de la producción de carne como resultado de la interacción entre las diferentes ramas de la ganadería enfocada a la obtención de ganado para abasto y las preferencias del consumidor.¹

En la producción de carne en el país, como en otras actividades de la industria ganadera, se presenta una gran variedad de sistemas productivos de acuerdo a las condiciones, características y disponibilidad de recursos de cada región y estos pueden ser desde los de tipo familiar hasta los tecnificados e integrados.

En una gran cantidad de regiones del país uno de los sistemas de producción más utilizado es la cría de ganado bovino en pastoreo o de forma extensiva, ya que las regiones tropicales en México comprenden más de 24 millones de hectáreas, las cuales poseen un gran potencial forrajero para los bovinos, siendo esta la fuente de sustento más abundante y económica para producir leche y carne de forma económica.³

En la actualidad uno de los problemas que afrontan los hatos bovinos criados en este tipo de sistemas productivos es la baja fertilidad, que ha tenido un significativo impacto económico negativo en la productividad tanto del ganado de carne como de leche. En el país, por ejemplo, se reportan intervalos parto-primer servicio por encima de los 100 días, intervalos parto-concepción muy cercanos a los 150 días, intervalos entre partos de más de 450 días y porcentajes del 36% en la detección de calores.⁴ Debido a este problema, en la industria ganadera se han realizado investigaciones para aumentar la eficiencia reproductiva de estos hatos, tratando de mejorar los programas de sincronización de celos, la sincronización de la ovulación, los sistemas para la detección de calores, los programas de Inseminación Artificial (IA) e incluso se ha intentado mejorar la eficiencia del semen utilizado en la IA.

HIPÓTESIS.

La adición de 25 µg/ml de Antígeno Asociado a la Fertilidad (FAA) y 25 µg/ml de Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2 (TIMP-2) al semen bovino congelado a una dosis de 10×10^6 de espermatozoides aumentará los porcentajes de fertilidad en un programa de inseminación artificial en el trópico.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la adición de dos Proteínas Ligadoras de Heparina (25 µg/ml de Antígeno Asociado a la Fertilidad y 25 µg/ml de Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2) al semen bovino congelado sobre los porcentajes de gestación en un programa de inseminación artificial con dosis reducida (10×10^6 espermatozoides/pajilla) en condiciones de trópico.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Realizar un análisis descriptivo de resultados colaterales obtenidos, como el porcentaje de retención de dispositivos intravaginales y la presentación de celos.

- Realizar un análisis descriptivo de los resultados derivados del diseño del trabajo como son gestación por grupo de semen utilizado, incluyendo otras variables como edad de la hembra, raza y condición corporal.

REVISIÓN DE LA LITERATURA.

La implementación de tecnologías reproductivas en los últimos años ha tenido gran importancia en la industria ganadera del país debido a las exigencias de producción.

Una de las tecnologías reproductivas cada vez más utilizadas en el país ha sido la Inseminación Artificial (IA), debido tanto a sus ventajas en el manejo de los animales como en la salud de éstos, sin embargo, la variabilidad en la fertilidad que tiene el ganado del trópico y las condiciones de manejo extensivo de muchas explotaciones han dificultado su implementación.

La IA es el método de reproducción por el cual se sustituye la cópula o apareamiento entre el macho y la hembra, por un sistema instrumental con el que se deposita el semen recolectado del macho en el aparato reproductor de la hembra.

Las ventajas de la IA incluyen el mejoramiento genético, uso de semen de alta fertilidad, programación de cruzamientos, mejor control de vientres, disminución de peligros e inconvenientes del mantenimiento de toros, mejores programas de reproducción y parición, además de ayudar al control de las enfermedades al usarse semen libre de enfermedades contagiosas y venéreas. Las desventajas de esta tecnología generalmente son relativas, como el costo del semen y el equipo, y la necesidad de la detección de celos por personal capacitado.^{4,5}

La implementación de este tipo de tecnologías exige el manejo y actualización de registros reproductivos y productivos individuales completos de cada animal, instalaciones adecuadas para el manejo de los animales y del material genético, así como de un programa nutricional y sanitario estricto.⁴

En el ganado bovino productor de carne, especialmente el mantenido en condiciones extensivas, generalmente se realiza la IA en una o dos ocasiones al año durante 2 ó 3 meses en cada uno, siendo común el empleo de la sincronización estral.⁵

Las principales limitaciones para el empleo de la IA en el ganado manejado en condiciones pastoriles son fallas en la detección de celos, anestro posparto y pubertad tardía. Este problema es mayor en ganado *Bos indicus* o las cruzas con *Bos indicus* debido a las particularidades en su comportamiento reproductivo y la dificultad de la observación de celos.^{6,7}

Para evitar los problemas relacionados con la detección de celos se han desarrollado protocolos de sincronización del celo y de la ovulación que permiten inseminar un gran número de animales en un período de tiempo pre-establecido. Estos tratamientos se conocen con el nombre de protocolos de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF). Los protocolos de IATF se pueden dividir en aquellos que utilizan combinaciones de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y Prostaglandina F₂α (PGF₂α), llamados protocolos Ovsynch y los que utilizan dispositivos con Progesterona (P4) junto con Estradiol.⁸ El protocolo Ovsynch ha producido una fertilidad aceptable para vacas de leche y de carne. Sin embargo, los resultados de su aplicación en hatos de cría manejados en condiciones de pastoreo no han sido satisfactorios debido a los bajos porcentajes de concepción que se obtienen en vacas en anestro.⁹ Los tratamientos con dispositivos de liberación de P4 pueden mejorar el desempeño reproductivo de las vacas, debido a su efecto benéfico sobre la frecuencia de pulsos de hormona luteinizante (LH), el crecimiento folicular y la ovulación. El efecto benéfico de la implementación de un sistema de este tipo depende en gran medida de un buen manejo nutricional y sanitario del hato. La Condición Corporal (CC) es tal vez el factor más determinante del porcentaje de preñez en programas de IATF, por lo que ésta debe de ser evaluada antes de iniciar un tratamiento de sincronización de

celos, y en caso de ser inadecuada debe de suplementarse el ganado, a fin de que sea posible obtener resultados aceptables.⁹

La CC es una evaluación subjetiva de la cantidad de energía almacenada en forma de grasa y músculo que una vaca posee en un momento dado. Los cambios en la misma constituyen una guía más confiable y práctica que el peso corporal para establecer el estado nutricional de la vaca y planear las estrategias de manejo a seguir con el fin de minimizar los desórdenes reproductivos. El concepto de CC se caracteriza por no hacer imprescindible el uso de la balanza, el tamaño del animal (asociado con la raza) y el estado fisiológico.¹⁰ La evaluación de la CC en bovinos se realiza por medio de la asignación de un índice en una escala de 1-5 o de 1-9, donde 1 es un animal emaciado y 5 ó 9 (dependiendo de la escala usada) es una animal obeso, con el fin de estimar las reservas de grasa corporal mediante la observación y palpación de costillas, columna vertebral, huesos de la cadera e inserción de la cola.¹¹

FACTORES QUE AFECTAN LA FERTILIDAD DEL GANADO *Bos indicus* EN EL TRÓPICO.

Una de las limitantes que afrontan los hatos bovinos criados en el trópico es su fertilidad sub-óptima, debida a la variabilidad estacional en la fertilidad y a diferentes factores y particularidades que influyen en el comportamiento reproductivo del ganado productor de carne.

Entre los factores que pueden influir sobre la fertilidad del ganado se encuentran los ambientales, el manejo, los nutricionales y la condición corporal (CC), así como las condiciones de la raza.

Ambientales.

A pesar de que se desconocen los efectos precisos de los componentes ambientales sobre la reproducción, se sabe que hay meses que favorecen la fertilidad del ganado cebú. Las épocas de mayor fertilidad varían según la

localidad geográfica, por ejemplo estudios en México, Florida y Cuba han indicado que la fertilidad del ganado cebú y sus cruzas es elevada durante la primavera y el verano, que coinciden con las épocas no lluviosa y la lluviosa respectivamente, mientras que durante el otoño y el invierno se registran las tasas de fertilidad más bajas. Dentro de los factores ambientales que afectan la fertilidad del ganado se encuentran el clima, la época del año y la precipitación pluvial.¹²

Clima.- Afecta directamente la capacidad reproductiva de la vaca, ya sea por estrés calórico o por bajas temperaturas, e indirectamente por la cantidad y calidad del forraje disponible. La elevada temperatura, especialmente si es acompañada de alta humedad relativa, provoca alteraciones de las constantes fisiológicas de las vacas, causando una menor manifestación de los signos del estro y disminución de la fertilidad. El estrés calórico inhibe la ciclicidad, con lo que se afecta la presentación de la pubertad y el reinicio de la actividad ovárica postparto.¹³

Época del año.- En el trópico la mayor fertilidad se ha observado en épocas de lluvias, a diferencia de las vacas de las regiones templadas, en las que la fertilidad es mayor en primavera. La época del año influye sobre el reinicio de la actividad ovárica posparto, el porcentaje de concepción a la primera inseminación, el número de servicios por concepción y el intervalo parto-concepción. El efecto de la época del año está determinado principalmente por una interacción de temperatura, fotoperiodo, precipitación pluvial y disponibilidad de forrajes.^{12,13}

Precipitación pluvial.- En el trópico clasificado principalmente como húmedo, la disponibilidad del pasto está en relación directa con la mayor precipitación pluvial, por tal motivo se le considera como un factor determinante en el comportamiento reproductivo de los bovinos, existiendo una correlación positiva entre concepción y precipitación pluvial.¹³

Manejo.

Uno de los principales factores que influyen en las bajas tasas de gestación en el ganado cebú es el mal manejo del ganado, el cual incluye las fallas en la detección de estros, ya que la detección de estro en los periodos pre-servicio, servicio y post-servicio afecta directamente la edad a primer servicio, el intervalo parto-primer servicio, el intervalo parto-concepción y el intervalo entre partos. Un problema particular es que tanto los primeros estros de la vida del animal, como los que ocurren en los primeros 75 días postparto son menos intensos y más cortos que los que ocurren posteriormente, lo que complica la detección de calores. Otras causas que provocan una mala detección del estro son el desconocimiento de los signos del estro y el no dedicar el tiempo suficiente para su detección.¹⁴

Otro factor es el tipo de destete que se lleva a cabo, ya que en hatos de vacas productoras de carne se alarga el intervalo entre partos al prolongarse el periodo entre el parto y el destete. El amamantamiento alarga el anestro postparto, debido al bloqueo lactacional que sufren los animales, ya que hay una reducción en los pulsos de GnRH y LH que hacen que los folículos no crezcan lo suficiente para alcanzar el tamaño pre-ovulatorio y que puedan producir concentraciones de estradiol necesarias para provocar un pico de LH y por lo tanto la ovulación. Además, la falta de ovulación después del parto no solo depende de señales somatosensoriales causadas a la glándula mamaria por el becerro, sino que existen otros factores, como la visión, el olfato o la sola presencia física del becerro, que son capaces de inhibir la actividad reproductiva postparto.¹⁵

El efecto del amamantamiento ha sido señalado como factor importante en el retraso de la presentación del primer calor después del parto. Se ha demostrado que vacas a las que se les han destetado los becerros en forma precoz presentan periodos más cortos entre el parto y el primer estro, obteniendo un mayor porcentaje de gestaciones y acortando el intervalo entre partos.¹³

Nutricionales.

La influencia que ejerce la nutrición sobre la ovulación y sobre las manifestaciones externas del celo es fundamental. Si existen variaciones en la nutrición que inciden en el metabolismo, las manifestaciones de celo variarán correlativamente en la misma proporción.¹⁶

Si las vacas son alimentadas en exceso pueden sufrir trastornos reproductivos, pero más comúnmente en el trópico la baja fertilidad se debe a una nutrición deficiente. Cuando el nivel nutricional es bajo, aunque permita la primera concepción, alarga notablemente el anestro posparto, provocando una sensible disminución en la eficiencia reproductiva de los vientres en su segunda temporada de servicios. La vaca de primer parto no está adaptada a las exigencias de la gestación y sobre todo de la lactancia, acusando en mayor grado el impacto de una nutrición insuficiente, debido a que todavía está en crecimiento.¹⁷

Nivel de energía.

La cantidad de energía que consume el animal en el periodo prepuberal, influye directamente sobre la presentación de la pubertad, así mismo la disponibilidad de energía antes y después del parto, influye sobre el reinicio de la actividad ovárica postparto y la consiguiente presentación del primer estro.

Las vacas que pierden peso antes y después del parto entran en anestro prolongado, lo que representa una mayor dificultad para quedar gestantes, ocasionando pérdidas económicas por reducción del número de crías durante su vida útil, este efecto se agudiza en vacas primerizas sobre todo bajo condiciones de alimentación deficiente.¹³

Por otra parte, la deficiencia proteica y/o energética frecuente en praderas naturales de crecimiento estacional modula la actividad ovárica, disminuyendo la actividad sexual cíclica en el post-parto.¹⁶

Suplementación.

En épocas de escasez de forraje, se presenta un bajo nivel nutricional, que causa anestro y reducción en el porcentaje de concepción. Al proporcionar una suplementación alimenticia antes y después del parto la función reproductiva mejora.¹³

Las vaquillonas con baja ingesta de fósforo muestran signos variables de celo. Esto es importante cuando se aplica IA, pues pueden ser inseminadas en un momento inadecuado. Un nivel correcto de vitamina D reduce la influencia de la deficiencia de fósforo sobre la fertilidad. El mantenimiento de un nivel satisfactorio de vitamina D puede verse dificultado cuando el consumo de caroteno es demasiado alto. Al respecto, en el trópico para corregir algunas deficiencias nutricionales se emplea la suplementación y la más utilizada es la combinación de melaza con urea al 2% y en menor proporción forrajes de corte y ensilado, así como suplementación con sales minerales y bloques multinutricionales.¹⁶

Condición Corporal (CC).

Es un indicador certero del estado nutricional y de la ciclicidad de la hembra. La evaluación de la CC como reflejo del estado nutricional de los animales, permite determinar su influencia en el potencial reproductivo, especialmente sobre la secreción de gonadotropinas, la concentración plasmática de progesterona, la función ovárica, la calidad del ovocito y del embrión, así como también sobre la involución uterina y la tasa de concepción. De esta manera, las reservas de energía al momento del parto son el factor con mayor efecto sobre la tasa de preñez, ya que en ganado de carne si éstas se encuentran reducidas se hace más notable la supresión de la función ovárica en el periodo posparto temprano, con aumento del intervalo parto-primer estro y bajas tasas de concepción.¹¹

Wright *et al.*¹⁸ han señalado que las vacas de carne con mala CC presentan inhibición de los pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) procedentes del hipotálamo, lo que indica que el efecto de la CC en la duración del

período de anestros posparto está dirigido a través de la frecuencia de los pulsos de hormona luteotrófica (LH). Blanco *et al.*¹⁶ encontraron en trabajos diferentes una alta relación entre la CC y el anestros posparto, de modo que por cada unidad de incremento de CC, el período parto-primer celo decreció en 43 y 86 días en dos estudios respectivos.

Por lo anterior el desempeño reproductivo de las vacas de carne está directamente relacionado con las reservas de grasa, o con la condición corporal de las vacas al parto. Si las reservas corporales de grasa no están disponibles, se afectará la secreción de hormonas hipofisarias después del parto y los ciclos estrales no se iniciarán durante la estación reproductiva. Los compuestos metabólicos y las hormonas como la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-1), pueden enviar señales al hipotálamo y a la hipófisis de cómo se encuentra el “nivel de energía” de la vaca. Cuando las vacas tienen adecuadas reservas de energía, los ciclos estrales se iniciarán.¹⁹

Raza.

En los sistemas de cría y engorda en el trópico de México predominan el ganado *Bos indicus* (Cebú) y las cruzas de *Bos indicus* x *Bos taurus*, debido a su fácil adaptación y resistencia al calor, la humedad, los insectos y las enfermedades prevalentes en el trópico mexicano.^{4,6}

El *Bos indicus* a diferencia del *Bos taurus*, se caracteriza por presentar baja eficiencia reproductiva, además de los bajos porcentajes en la detección de estros lo cual se explica debido a que el celo en animales tipo cebuino es significativamente más corto, alrededor de 11 horas, asociado a una alta incidencia de celos nocturnos (30%-50%) y su manifestación es menos evidente e intensa comparada con la reportada para ganado *Bos taurus*.^{4,6}

Otra diferencia es en la fisiología reproductiva entre el *Bos indicus* y *Bos taurus*, la cual puede influenciar la respuesta a los protocolos de sincronización de celos y

ovulación. La dinámica folicular de las hembras *Bos indicus* fue caracterizada por la presencia de 2 o 3 ondas de crecimiento folicular en la mayoría de los ciclos estrales, muy similar a lo descrito para *Bos taurus*, sin embargo los diámetros máximos del folículo dominante (alrededor de 11 mm) y del cuerpo lúteo (aproximadamente 17 mm) son menores a los de *Bos taurus*, y se han reportado también niveles circulantes inferiores de estradiol y progesterona.^{4,6,20}

Estos y otros problemas asociados con el bajo rendimiento reproductivo en ganado cebuino han sido limitantes para mejorar la fertilidad del ganado con programas de IA, por lo que ha sido necesario implementar estrategias para mejorar la fertilidad del ganado.

En la siguiente parte de este trabajo se presenta una revisión de literatura sobre una serie de proteínas encontradas en el líquido seminal de los toros, su relación con los espermatozoides y el uso que se les ha dado a éstas para determinar y tratar de aumentar la fertilidad de los toros, y para mejorar los parámetros reproductivos del hato.

PROTEÍNAS EN EL LÍQUIDO SEMINAL.

Durante la eyaculación, los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo se mezclan con secreciones de las glándulas sexuales accesorias. Estas glándulas proveen al espermatozoide de nutrientes y varios factores que modifican la superficie espermática. Los componentes del plasma seminal pueden modificar la membrana plasmática del espermatozoide y han sido implicados en evitar o facilitar la capacitación y la reacción acrosomal.²¹

Dentro de los componentes en el líquido seminal se encuentran una serie de proteínas estrechamente relacionadas llamadas BSP-A1/-A2, BSP-A3 Y BSP-30kDa y en conjunto son llamadas proteínas del plasma seminal bovino (Bovine Seminal Plasma, o proteínas BSP).²²⁻²⁴ Estas proteínas constituyen la principal fracción de proteínas del plasma seminal bovino (50-70% o 35-50 mg/ml) y son

productos de la secreción de las glándulas sexuales accesorias (ámpulas, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales o de Cowper).^{24,25}

Las BSP-A1/-A2 y BSP-A3 tienen pesos moleculares de 15-16.5 kDa, con puntos isoeléctricos (pI) de 4.7-5.2, mientras que la BSP-30 kDa tiene un peso molecular de 28-30 kDa, pI 3.9-4.6.²³ Todas las proteínas de esta familia son glicoproteínas, con excepción de BSP-A3. La BSP-A1 contiene azúcares neutros, galactosamina y ácido siálico, mientras que la BSP-A2 contiene galactosamina y ácido siálico en menos cantidad que la BSP-A1 pero no contiene azúcar neutra. La BSP-30 kDa contiene azúcares neutros, galactosamina y ácido siálico, es el miembro más glicosilado de esta familia. Las BSP-A1/-A2 (también llamadas PDC-109) tienen una secuencia de aminoácidos idéntica y su diferencia reside en el grado de glicosilación.^{26,27} La PDC-109 está compuesta de 109 aminoácidos, BSP-A3 tiene 115 aminoácidos y BSP-30kDa 158 aminoácidos.²⁸

Las proteínas BSP se unen al espermatozoide durante la eyaculación a través de su interacción con los fosfolípidos de colina que se encuentran en la membrana espermática y representan más del 60% del total de fosfolípidos de ésta.^{23,24,29}

Proteínas similares están presentes en el líquido seminal y/o en las secreciones de las vesículas seminales de humanos, hámsters, ratones, ratas, caballos, cerdos, cabras y búfalos.³⁰⁻³⁴

PROTEÍNAS LIGADORAS DE HEPARINA: Antígeno Asociado a la Fertilidad (FAA) e Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2 (TIMP-2).

Otro grupo de proteínas del plasma seminal asociado con la fertilidad fue aislado en base a su propiedad de unir heparina y su diferente afinidad por ésta. Este grupo está representado por 5 clases de proteínas ligadoras de heparina (Heparin-binding proteins o HBPs) con pesos moleculares que van de 14 a 31 kDa en toros *Bos taurus* y se le conoce a este complejo de proteínas como HBP-B5 (31, 24, 21.5 y de 14-18 kDa).^{35,36} La concentración promedio del total de HBPs es de 19.2

mg/ml de eyaculado en el plasma seminal bovino y 0.14 mg/ml de eyaculado en la membrana espermática.²³

Las HBP de mayor peso molecular son las HBP de 24 y 31 kDa y son detectadas por su gran afinidad a la heparina. Las proteínas se unen a la heparina, que es un glicosaminoglicano (GAG), y a Lipoproteínas de Alta Densidad (High-Density Lipoprotein o HDL).^{22-24,37} Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos lineales no ramificados que son capaces de promover la reacción acrosomal en espermatozoides de toro y conejo *in vitro*. La unión específica de GAGs como la Heparina fue reportada para espermatozoides de humano, toro, conejo y mono.^{35,38} Sin embargo, la heparina no está presente en los fluidos del tracto genital de la hembra, pero es usada comercialmente para inducir la capacitación espermática *in vitro*.³⁹

Por otra parte, los GAGs se encuentran en el líquido folicular y en todas las regiones del tracto reproductor de la hembra, en vacas, ovejas, yeguas y mujeres.^{22,38,40-43}

La heparina induce la capacitación *in vitro* en espermatozoides de bovino, caprino y equino. En los bovinos, la heparina se une al espermatozoide a través de proteínas de unión (proteínas BSP) situadas en la membrana celular, produciendo cambios en el medio intracelular del espermatozoide. Esto produce la captación de Ca^{2++} y un incremento del calcio libre intracelular que conlleva a un incremento del pH intracelular; otro cambio asociado es un incremento en la fosforilación de proteínas tirosinas.^{22,44} Los toros con mayor fertilidad producen espermatozoides con mayor afinidad a la heparina que los toros de menor fertilidad. El incremento de la afinidad a la heparina corresponde a un incremento en la tasa de reacción acrosomal del espermatozoide.^{38,45,46}

Muchos estudios han mostrado que las HDL presentes en el líquido folicular y oviductal inducen la capacitación espermática, ya que facilitan la salida de colesterol que ocurre durante la etapa temprana de la capacitación. La HDL es la única lipoproteína encontrada en el tracto reproductor de la hembra. En los bovinos, los niveles de HDL se elevan durante el periodo de estro y son bajos durante el resto del ciclo estral (Figura 1).^{22,29,37}

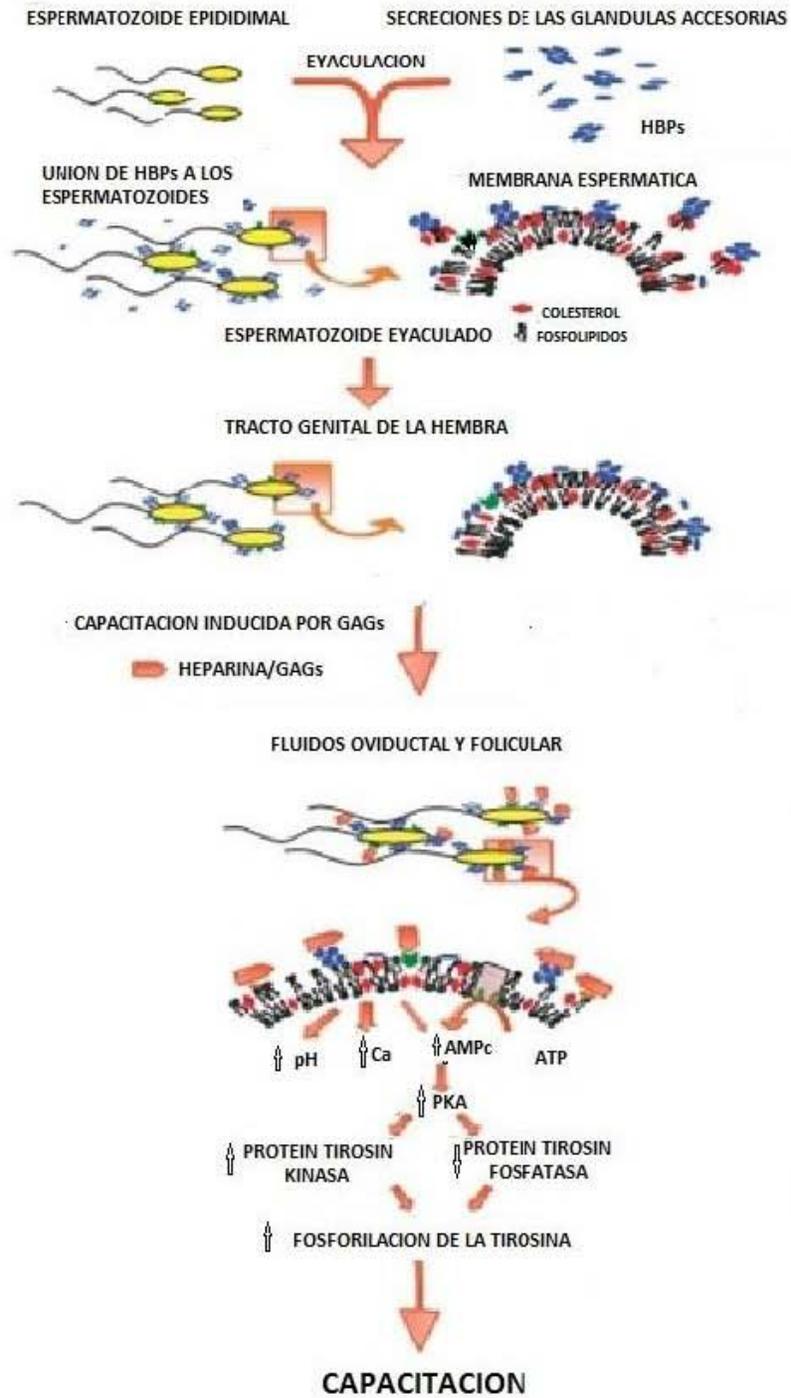


FIGURA 1. Mecanismo de capacitación espermática mediado por proteínas HBPs (Modificado de Manjunath, 2007²⁹).

Estas proteínas son secretadas por las glándulas sexuales accesorias del toro, se ha demostrado que son testosterona dependiente en ratas, ya que ésta es necesaria para la producción de HBPs⁴⁷ y se adhieren a la membrana del espermatozoide en el momento de la eyaculación.⁴⁸ Un estudio realizado por McCauley *et al.*³⁶ por medio de inmunofluorescencia de un anticuerpo monoclonal (M1) desarrollado por Bellin *et al.*,⁴⁵ mostró que las HBPs durante la capacitación se encontraban unidas a la región del acrosoma y a la región postacrosomal, y con menor afinidad en la región de la pieza media del espermatozoide eyaculado. Miller *et al.*³⁵ encontraron un aumento del 17% en el porcentaje de fertilidad de toros que presentaban el complejo HBP-B5 en la membrana espermática, pero no en el líquido seminal. Bellin *et al.*⁴⁵ encontraron en su estudio, utilizando un anticuerpo monoclonal para reconocer las proteínas 21.5, 24 y de 30 kDa (valor utilizado en este estudio para la proteína de 31kDa), que toros Santa Gertrudis con estas proteínas o solo con la proteína de 30 kDa en la membrana espermática eran 40% más fértiles que toros sin estas tres HBPs. Los toros con la HBP-30 y -21.5 kDa en el semen tenían una fertilidad intermedia de 61.3%, por lo que la interacción entre la HBP-30 y -24kDa podría ser importante para la fertilidad.

Aunque todas la HBPs pueden unirse a la superficie espermática, solo una proteína ha sido relacionada con el aumento de la fertilidad y ha sido considerada como un marcador bioquímico para predecir la fertilidad potencial de los toros, esta proteína es la HBP-31kDa o también llamada Antígeno Asociado a la Fertilidad (Fertility-Associated Antigen o FAA). Esta proteína ha sido reportada también como una proteína de 30kDa ya que con frecuencia es identificada entre los 29 y 31kDa y representa el 0.8% del total de HBPs (Figura 2).^{23,49-51}

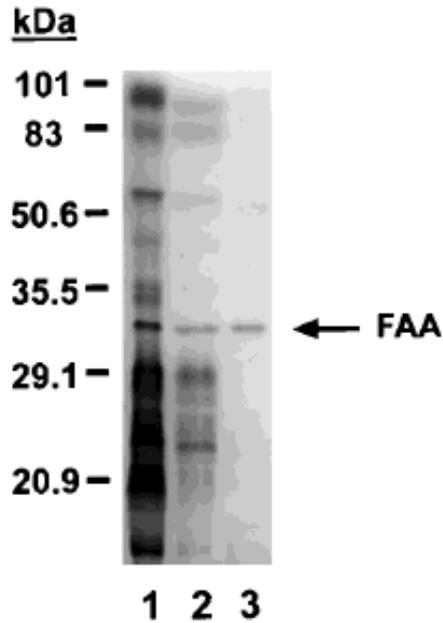


FIGURA 2. Identificación del Antígeno Asociado a la Fertilidad (FAA) por medio de SDS-PAGE. (Modificado de McCauley et al, 1999⁵²).

La FAA tiene una fuerte similitud (73% idéntica) con la proteína deoxiribonucleasa I de humano (DNasa-I), no es glicosilada y tiene un pI de 7.5-8.0. No hay similitudes compartidas entre FAA y la secuencia de aminoácidos de la BSP-30 kDa, por lo que es una proteína única y el primer reporte de una isoforma de DNasa I en el semen bovino.²⁷

En un estudio realizado por Bellin *et al.*⁵³ se encontró que los toros positivos a FAA eran 9% más fértiles que los toros negativos para este antígeno. En otro trabajo, Sprott *et al.*⁴⁹ observaron que el promedio de gestaciones fue de 15.9% mayor cuando se usaban toros positivos a FAA (65.5% vs. 49.7%) y McCauley *et al.*⁴⁸ encontraron que los toros positivos a FAA eran también más eficientes para preñar vacas en comparación con los toros negativos a FAA.⁵⁴

Otra proteína identificada como un marcador de la fertilidad del toro es la proteína HBP-24 kDa, que fue purificada y aislada del líquido seminal bovino por tener afinidad a la heparina. El análisis de la secuencia de aminoácidos del

extremo N-terminal, la inmunquímica y los datos bioquímicos sugieren que la HBP-24 es TIMP-2 o Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2 (Tissue Inhibitor of Metaloproteinasas-2), esto debido a que la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal son 90% idénticos entre HBP-24 y TIMP-2.⁵⁰

La proteína TIMP-2 fue aislada del líquido seminal bovino por Calvete *et al.*⁵⁵, pero previamente fue aislada de células del endotelio aórtico de bovino por DeClerck *et al.*⁵⁶

El RNAm de TIMP-2 está presente en las células de Sertoli y Leydig de ratas pero no en las células germinales, TIMP-2 también fue detectada en glándulas bulbouretrales, próstata y vesículas seminales en los bovinos, lo cual sugiere que esta proteína está asociada con las membranas espermáticas y puede tener un papel importante en la regulación de la fertilidad del toro.⁴⁹ Se ha encontrado en el tracto reproductor del macho y en el semen de humanos, ratas, borregos y caballos (Figura 3).⁵⁷⁻⁶⁰

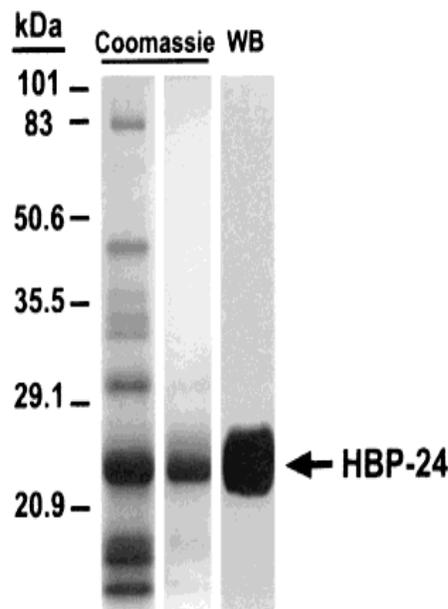


FIGURA 3. Identificación de *Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2* (TIMP-2) por medio de Coomassie y Western Blot (Modificado de McCauley et al, 2001⁵⁰).

Los TIMPs regulan diversos procesos fisiológicos incluyendo eventos asociados con la ovulación, la fertilización y el desarrollo embrionario.⁵⁰ También inhiben la actividad enzimática de las metaloproteinasas (MMPs) y por lo tanto regulan la degradación de la matriz extracelular (ECM), tanto en estado normal como en estado de enfermedad. También funcionan como inhibidores de proteasas en el semen de mamíferos y protegen a los espermatozoides de la digestión enzimática por las metaloproteinasas.^{50,56,61,62}

En un estudio realizado por Dawson *et al.*⁶³, al comparar el porcentaje de gestaciones en vacas de razas productoras de carne expuestas a toros positivos o negativos a la proteína TIMP-2, se encontró que los toros positivos a TIMP-2 fueron 13% más fértiles que los toros negativos a la proteína (86.1% vs. 72.9%). En otro trabajo Mills⁶⁴ encontró que los porcentajes de gestación aumentaban un 16% cuando los toros usados para monta directa eran positivos a TIMP-2. En un estudio reciente realizado bajo condiciones de trópico, Álvarez⁶⁵ menciona haber obtenido porcentajes de gestación del 40% en vaquillas cruza *Bos indicus* x *Bos taurus* sincronizadas e inseminadas con semen con HBPs y 16% de gestaciones con semen sin HBPs, concluyendo que empleando pajillas con una concentración espermática de 25 millones el semen con HBPs aumentó la fertilidad con respecto al semen testigo.

En síntesis, se han utilizado múltiples estrategias para tratar de aumentar el rendimiento reproductivo en programas de IA en el ganado bovino, desde las más simples como aumentar la dosis del semen (usar mayor concentración o doble inseminación) o modificar el sitio de depósito del semen (cuerno uterino ipsolateral a la ovulación), intermedias como usar programas de sincronización de las ondas foliculares y de los celos,⁷ o inseminar a tiempo fijo,^{6,8,9} hasta las más complejas que incluyen el uso de semen de toros positivos a FAA^{38,49} y añadir proteínas recombinantes al semen congelado.⁶⁵

JUSTIFICACIÓN.

A pesar de que recientemente se ha reportado el uso de las Proteínas Ligadoras de Heparina (HBPs) y su adición al semen bovino congelado, solamente se ha reportado un trabajo sobre su efecto en la fertilidad en programas de inseminación artificial en el trópico. Por lo anterior, se decidió realizar este trabajo para contribuir al conocimiento del efecto de las HBPs (Antígeno Asociado a la Fertilidad e Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2) sobre la fertilidad al adicionarse al semen bovino congelado en un programa de IA en el trópico, utilizando una dosis de 10 millones de espermatozoides por pajilla (dosis reducida de semen).

MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación en colaboración entre la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, la Universidad de Texas A&M y la Compañía Comercial Sexing Technologies (Navasota, Texas, USA).

El estudio se llevó a cabo del mes de julio al mes septiembre del año 2010, en un rancho ganadero comercial de tipo extensivo en pastoreo, en donde los animales estaban bajo el mismo sistema de producción, manejo, alimentación y suplementados con sales minerales, en condiciones de trópico húmedo mexicano.

LOCALIZACIÓN.

El rancho ganadero se localiza en el municipio de Emiliano Zapata en el estado de Tabasco, el cual se localiza en la región del río Usumacinta y tiene como cabecera municipal a la ciudad de Emiliano Zapata, la que se encuentra ubicada al sur del estado, entre los paralelos 17°44' de latitud norte y 91° 46' de longitud oeste. Colinda al norte con el estado de Campeche; al sur con Chiapas; al este con los municipios de Balancán y Tenosique y al oeste con Jonuta. La extensión territorial del municipio es de 437.40 km², los cuales corresponden al 1.78% respecto del total del estado; y ocupa el 15° lugar en la escala de extensión municipal. El clima es cálido-húmedo, con abundantes lluvias en verano. Tiene una temperatura media anual de 26.55°C, siendo la máxima media mensual en mayo de 30.9°C, con 22.7°C y la mínima media en enero y febrero con 22.7°C; la máxima y mínima absolutas alcanzan los 43°C y 14°C respectivamente. Una pequeña parte al sur del municipio limitando con el estado de Chiapas, tiene clima cálido-húmedo con lluvias todo el año (Af); éstas lluvias decrecen ligeramente en invierno, período en el cual se registra el 14.4% del total anual. El régimen de precipitación se caracteriza por un total de caída de agua de 1,864 mm anuales, con un promedio máximo mensual de 318 mm en el mes de septiembre y mínima mensual de 12 mm en el mes de abril. La humedad relativa promedio anual se

estima en 80%, con máxima de 85% en febrero y marzo, y la mínima de 75% en mayo.⁶⁶

CARACTERISTICAS Y MANEJO DE LAS HEMBRAS.

Se trabajó con vacas y novillas, 47 de la raza Brahman y 51 de la raza Nelore (n= 98). Las hembras fueron manejadas en pastoreo rotacional, en praderas de pasto Humidicola (*Brachiaria humidicola*), Brizantha (*Brachiaria brizantha*), Mombasa (*Panicum maximum*) y suplementadas con sales minerales preparadas con sal común, Magnaphoscal y Superbayphos (Bayer, Alemania).

Al iniciar el estudio para seleccionar a las hembras fueron palpadas vía rectal y revisadas por medio de ultrasonido de tiempo-real (modo B) con transductor lineal de 7.5 MHz (VetPreg, Estados Unidos) para verificar que estuvieran libres de patologías del tracto reproductor y ciclando, esto es, que presentaran estructuras ováricas como cuerpos lúteos y/o folículos ≥ 10 mm de diámetro para ser seleccionadas.

También en todas las hembras se evaluó la CC, utilizando la escala de puntuación 1-9 descrita por Wagner et al.⁶⁷, en la que 1 es un animal emaciado y 9 un animal obeso, con el fin de estimar las reservas de grasa corporal mediante la observación y palpación de costillas, columna vertebral, huesos de la cadera e inserción de la cola.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL SEMEN CON HBPs.

El semen adicionado con proteínas ligadoras de heparina (HBPs) y sin HBPs fue preparado, congelado y proporcionado por la Compañía Sexing Technologies (Navasota, Texas, USA).

Obtención del Semen.

Para este estudio se seleccionó el semen de un semental de la raza Brahman (Mr. Horsegate 431) el cual fue colectado mediante el uso de una vagina artificial previamente desinfectada, con una temperatura inicial de 43 a 46 °C.⁶⁸

Criterios de selección del semen.

A las muestras de semen obtenidas se les evaluó motilidad, concentración y morfología espermática, y para ser seleccionadas debían cubrir los siguientes criterios: 1) Motilidad mínima de $\geq 55\%$, 2) Concentración mínima de $\sim 900 \times 10^6$ ml, 3) Anormalidades primarias $\leq 15\%$, anormalidades secundarias $\leq 15\%$ y anormalidades totales que no excedieran de 25%. También las muestras fueron evaluadas después de la congelación o post-congelación. La motilidad y la integridad acrosomal se evaluaron bajo los siguientes criterios: 1) Motilidad progresiva $\geq 45\%$ a las 0 hrs y $\geq 30\%$ a las 3 hrs e integridad acrosomal $\geq 50\%$ a las 3hrs. Todas las evaluaciones de motilidad se realizaron a través de microscopía de campo claro (Nikon, Japón) a 400x; para evaluar la morfología espermática y la integridad acrosomal se usó microscopía diferencial de interferencia de contraste o Nomarski (Differential-Interference Contrast, DIC, Nikon, Japón) a 400x.

Obtención de las proteínas HBP.

Las proteínas ligadoras de heparina (Antígeno Asociado a la Fertilidad e Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2) fueron producidas y proporcionadas por la Compañía Sexing Technologies (Navasota, Texas, USA).

La proteína Antígeno Asociado a la Fertilidad (FAA) fue obtenida por medio de su clonación mediante un vector de expresión altamente inducible, expresado en *Escherichia coli* (*E. coli*). El segmento clonado fue de 592 pares de bases del DNA complementario (cDNA) de la proteína FAA, correspondiente a los residuos de aminoácidos 73 a 269 de la proteína original.⁶⁹

Para obtener la proteína Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas-2 (TIMP-2) se aisló el mRNA total a partir de las vesículas seminales de bovino, por medio del cual se realizó RT-PCR, la clonación, la detección y el análisis de secuenciación de la proteína. Se obtuvo como resultado un segmento de 650 pares de bases del

cDNA del gen TIMP-2 bovino, el cual constituye el 96% del gen completo de TIMP-2 bovino.⁷⁰

Adición de las proteínas HBPs al semen.

Después de obtener los eyaculados y las proteínas HBPs, éstas fueron adicionadas directamente al semen fresco el cual tenía una temperatura de ~ 21°C al momento de la adición, y las proteínas fueron adicionadas a una dosis de 25 µg de FAA y 25 µg de TIMP-2 por ml de semen. Posteriormente se dejó reposar el semen adicionado con HBPs por 20 minutos para que las proteínas se fijaran a la membrana espermática.

Dilución del semen.

Al semen con y sin las proteínas ligadoras de heparina (HBPs) se le agregó el diluyente compuesto por TRIS (7.57 g), ácido cítrico monohidratado o CAM (4.32 g), Fructuosa (2.25 g), glicerol (15 ml), tilosina (100 µg/ml), gentamicina (500 µg/ml), lincomicina-espectinomicina (300/600 µg/ml) (Minitube, Alemania) / Yema de huevo (50 ml), agua nanopura 18.2MiliQ aforada a 250ml, a un pH de 6.8 y a una osmolaridad de ~300±5 mOsm.

Envasado y congelado del semen.

Posterior a la dilución se realizó el envasado en pajillas de 0.5 ml, a una concentración de 10 millones de espermatozoides por pajilla (20 millones de espermatozoides por ml) con un equipo Straw Filler (Minitube, Alemania). Para el semen con HBPs se utilizaron pajillas de color amarillo y para el semen testigo se utilizaron pajillas transparentes. La congelación de las pajillas se hizo con un equipo para congelación automática (Digital Programmable Semen Freezer, EEUU).

Evaluación post-congelación del semen.

Después del proceso de congelación se evaluaron la motilidad y la integridad acrosomal del semen con y sin proteínas ligadoras de heparina, tomando en cuenta los criterios antes mencionados.

PROTOCOLO PARA SINCRONIZAR LA OLEADA FOLICULAR, EL CELO Y LA OVULACIÓN.

A las 98 hembras de este estudio se les aplicó el siguiente protocolo de sincronización:

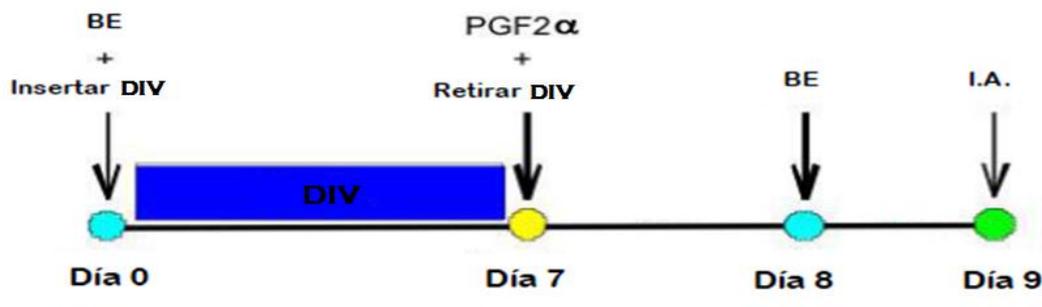


FIGURA 4. Protocolo para sincronizar la oleada folicular, el celo y la ovulación.

El primer día del estudio o día 0, a todas las hembras se les colocó un dispositivo intravaginal (DIV) impregnado con 1.9 g de Progesterona natural (P₄) y se les aplicaron por vía intramuscular 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE). El DIV permaneció por 7 días.

El día 7, se les retiró el DIV y se les aplicaron 500 µg de Prostaglandina F2 alfa (PGF₂α) por vía intramuscular y 24 horas después o al día 8 se les administró 1 mg de BE por vía intramuscular a las vacas y 0.5 mg a las novillas.

El uso de estradiol en combinación con P₄ o progestágenos se llevó a cabo debido a que el estradiol induce regresión lútea y suprime el crecimiento del folículo antral. La administración de 5 mg de Estradiol-17β junto con dispositivos vaginales o implantes de progestágenos en ganado bovino sincroniza la

emergencia de una nueva onda folicular en promedio de 4.3 ± 0.2 días después. Otros estudios han evaluado el efecto de diferentes esteres de estradiol sobre el desarrollo de la onda folicular, por ejemplo el Valerato de Estradiol (VE) a una dosis de 5 mg resulta en una predicción menos exacta de la emergencia de la onda folicular en vaquillas de razas especializadas en carne. Sin embargo la administración de BE a una dosis de 2 mg por vía intramuscular en combinación con 50 mg de P₄ resulta en el inicio de una nueva onda de desarrollo folicular en 4.1 ± 0.1 días, con un rango de 3.5 a 5 días.⁷

La función fundamental de la aplicación de estrógenos en el inicio del tratamiento es provocar la atresia de los folículos existentes e impedir de esta manera la formación de folículos persistentes que interfieren negativamente en la fertilidad. Como la atresia es seguida por el comienzo de una nueva onda folicular a los 4 días, se asegura de esta manera la presencia de un folículo nuevo y un ovocito viable en el momento de retirar el dispositivo. La segunda administración de BE es fundamental para sincronizar la ovulación y obtener buenos índices de preñez.⁹

DETECCIÓN DE CELOS.

La detección de celos se realizó por observación directa de los animales y con el apoyo del método del crayón, que consiste en marcar a la vaca con una franja de crayón de color, de unos 35 a 40 cm de longitud y 4 a 5 cm de ancho, a lo largo de línea central de su grupa y maslo de la cola, terminando en donde comienza la cola propiamente dicha. El fundamento de esta técnica es que con las sucesivas montas que recibe durante el celo, la vaca pierde gradualmente la pintura del crayón, evidenciando de esta manera la aceptación de la monta.⁷¹

La observación de calores se realizó cuatro veces al día (03:30 a 05:00, 06:00 a 08:00, 09:00 a 11:00, 12:00 a 14:00 hrs), por lapsos de observación de dos horas; inició 24 hrs después del retiro del dispositivo intravaginal (DIV) o el día 8 y finalizó

hasta el momento en que se realizó la inseminación artificial (IA) o día 9. La hembra que era detectada en calor, se inseminaba a las 12 hrs. Las hembras que no se observaron en calor fueron inseminadas a tiempo fijo (IATF) a las 54 o 56 hrs después de retirar el DIV, o de 30 a 32 hrs después de la segunda aplicación de BE.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.

Las hembras fueron inseminadas por medio de la técnica rectovaginal y seleccionadas aleatoriamente para formaron dos grupos: un grupo que fue inseminado con el semen testigo (n= 50 hembras) que corresponde al semen congelado sin proteínas ligadoras de heparina (HBPs) y un grupo inseminado con el semen HBP (n= 48 hembras) que corresponde al semen congelado adicionado con HBPs.

En total se utilizaron 98 pajillas y todas las hembras fueron inseminadas por el mismo técnico inseminador.

DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN.

El diagnóstico de gestación se realizó a los 55 días después de la inseminación artificial por medio de ultrasonografía, utilizando un ultrasonido de tiempo-real (modo B) con transductor lineal de 7.5 MHz (VetPreg, Estados Unidos).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para determinar los efectos del grupo con proteínas ligadoras de heparina (HBPs) sobre los porcentajes de gestación de las hembras, los datos obtenidos en este estudio fueron analizados por Diferencia de Proporciones por Chi cuadrada utilizando el programa R.⁷²

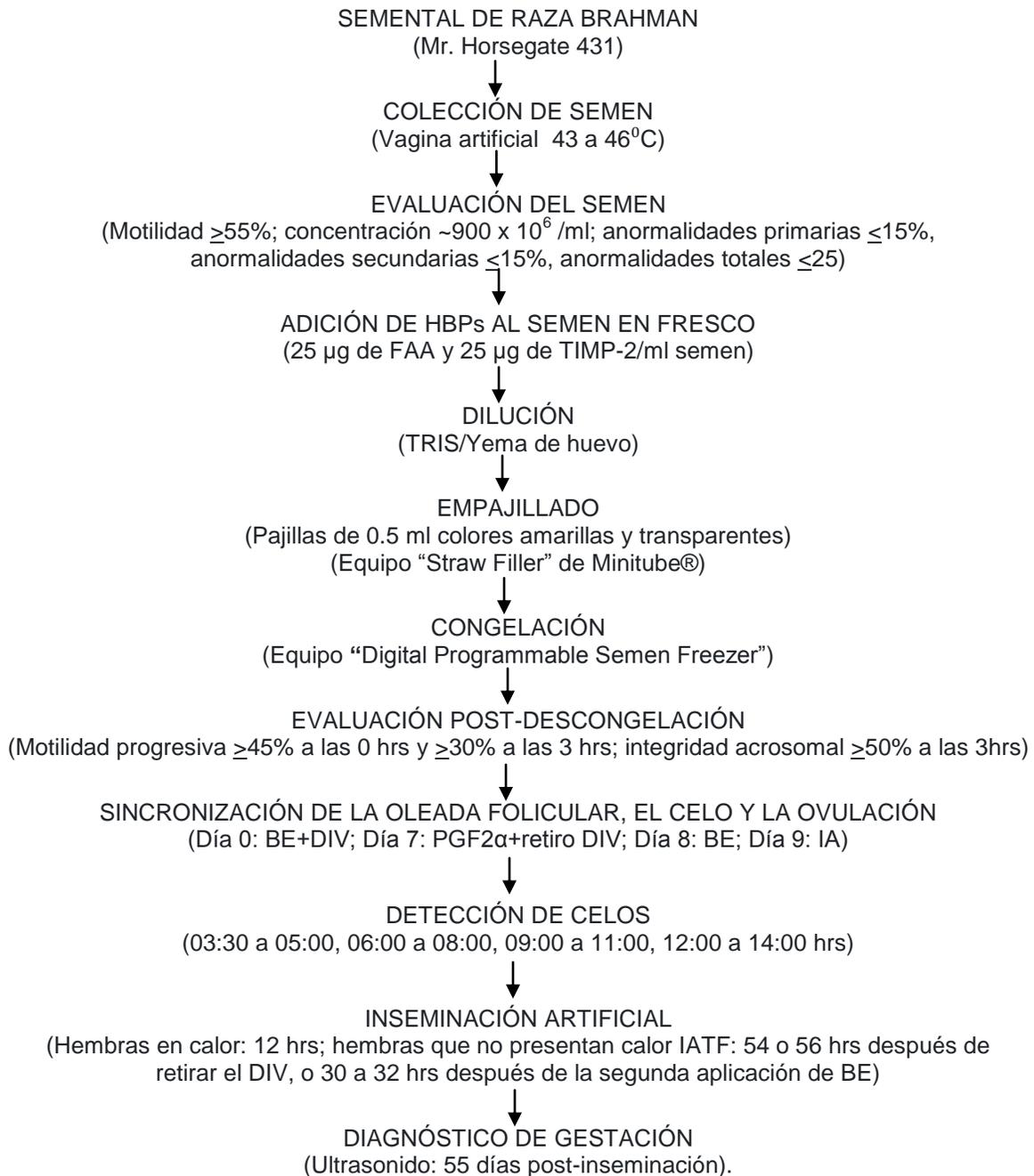


FIGURA 5. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para la obtención y preparación del semen con HBPs.

RESULTADOS.

Retención de DIVs.

El porcentaje de retención de DIVs que se observa en el Cuadro 1 para el grupo testigo fue de 96% y para el grupo HBP de 100%, lográndose un total de retención de DIVs del 97.9%, ya que solo 2 DIVs se perdieron en este trabajo.

Presentación de celos.

El porcentaje de presentación de celos para el grupo HBP de 95.8% y para el grupo testigo fue de 92.0%, sin mostrar una diferencia estadística ($P > 0.05$) entre grupos (Cuadro 1). Se observó un porcentaje total de presentación de celos de 93.8%.

CUADRO 1.

Porcentajes de retención de DIVs y de presentación de celos.

	GRUPO TESTIGO	GRUPO HBP	TOTAL
Retención de DIVs	48/50 (96%)	48/48 (100%)	96/98 (97.9%)
Presentación de celos	46/50 (92%)	46/48 (95.8%)	92/98 (93.8%)

Durante la detección de celos se observó que 38 hembras presentaron celo en la madrugada (3:30 a.m. – 5:00 a.m.), 35 hembras en horario de 6:00 a.m. a 8:00 a.m. y 19 entre 9:00 a.m. y 14:00 p.m. Sin embargo, se observó que las hembras de raza Brahman presentaron un calor más uniforme en cuanto a horario, presentándose éste entre las 3:30 a.m. y las 8:00 a.m. En contraste, las hembras de raza Nelore presentaron un calor en horarios más variados, desde las 3:30 a.m. hasta las 14:00 p.m. (Figura 6).

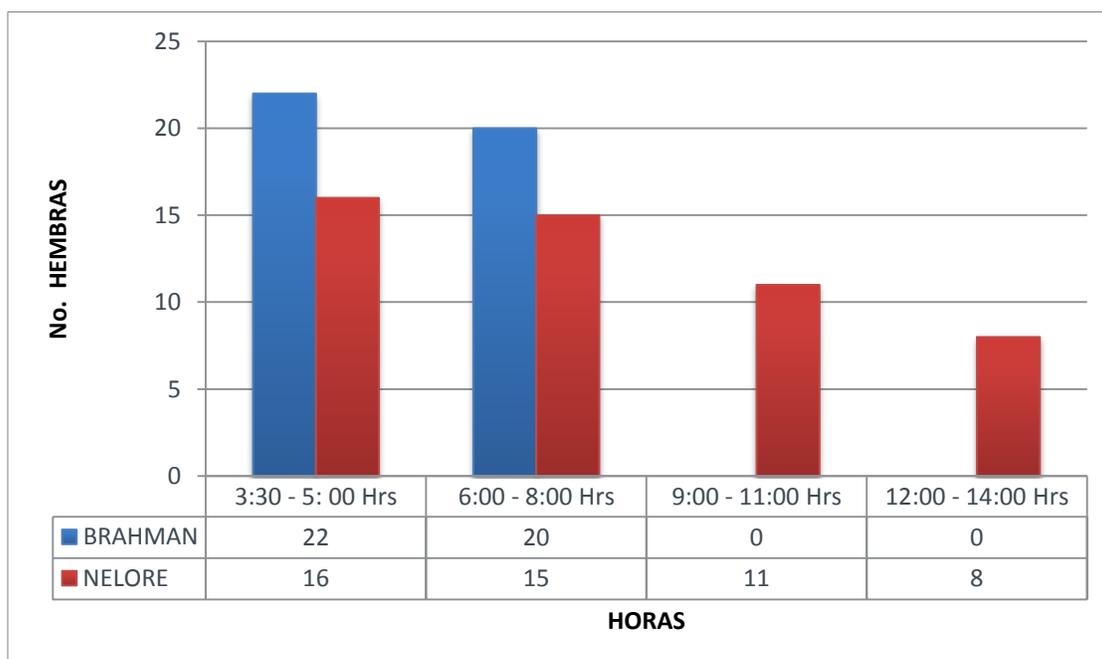


FIGURA 6. Presentación de celos por horas.

En cuanto a la presentación de calores en relación con la edad de las hembras, como se observa en la Figura 7, la mayoría de las novillas (21) presentaron calores en un horario de 3:30 a.m. a 5:00 a.m., mientras que la mayoría de las vacas (19) los presentaron entre las 6:00 a.m. y las 8:00 a.m. Sin embargo, la mayoría de las vacas y de las novillas entraron en calor entre las 3:30 a.m. y las 8:00 a.m.

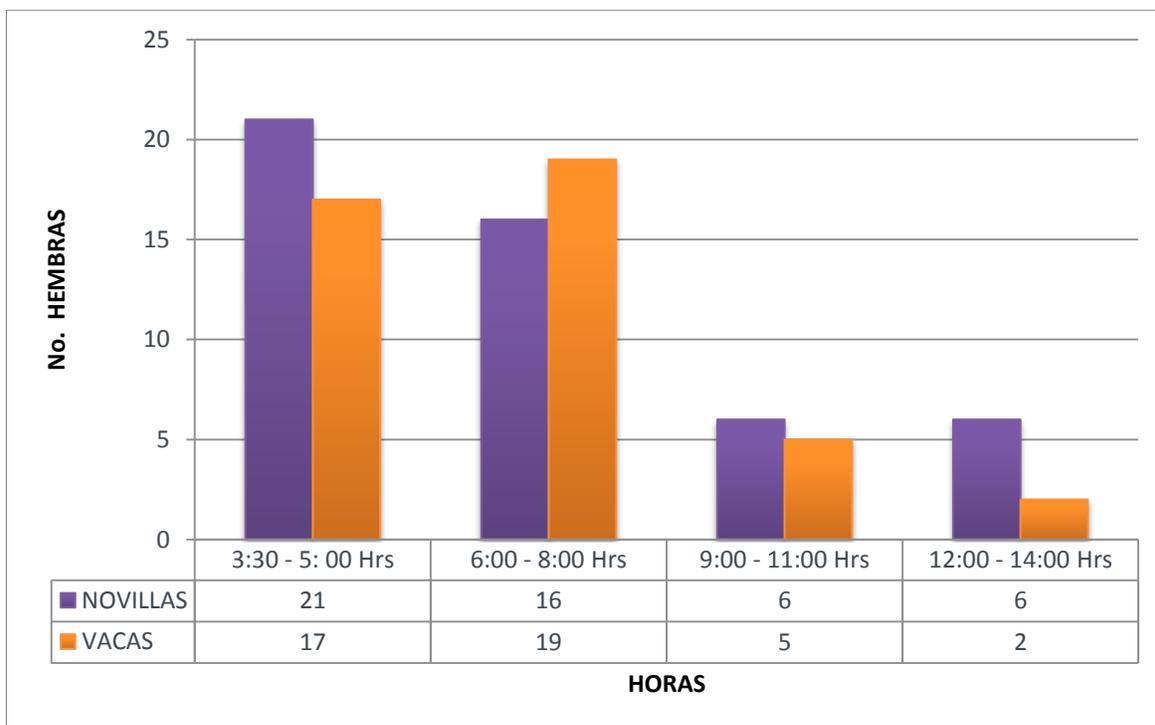


FIGURA 7. Presentación de celos por edad (horas).

Gestaciones.

En cuanto al porcentaje de gestaciones, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre grupos ($P < 0.05$), observándose un menor porcentaje de gestación en el grupo HBP (12.5%) en contraste con el grupo testigo (34%) (Cuadro 2).

CUADRO 2
Porcentajes de gestación observados.

SEMEN GRUPO TESTIGO			SEMEN GRUPO HBP			TOTAL
HEMBRAS	Gestantes	%	HEMBRAS	GESTANTES	%	
50	17	34 ^a	48	6	12.5 ^b	23/98 (23.5)

ab= Literales diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Como puede observarse en el Cuadro 3, no existe una diferencia estadística significativa entre el porcentaje de gestación total de vacas y el de novillas (31.9 vs. 15.6%, respectivamente). No se encontró un aumento en los porcentajes de gestación del grupo HBP tanto en novillas como en vacas. Sin embargo, el grupo testigo presentó un mayor porcentaje de gestaciones totales ($P < 0.05$).

CUADRO 3
Porcentajes de gestación observados por edad.

Edad	SEMEN GRUPO TESTIGO			SEMEN GRUPO HBP			Total
	Hembras	Gestantes	%	Hembras	Gestantes	%	
NOVILLAS	22	5	22.7 ^{ns}	29	3	10.3 ^{ns}	23/98 (23.5)
VACAS	28	12	42.8 ^{ns}	19	3	15.7 ^{ns}	15/47 (31.9%) ^{ns}
Total	50	17	34 ^a	48	6	12.5 ^b	23/98 (23.5%)

ab= Literales diferentes en las misma fila indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

ns= Indica diferencia estadística no significativa ($P > 0.05$).

Con respecto a los resultados mostrados en el Cuadro 4, se observó una diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de gestación de las hembras de raza Brahman al ser inseminadas usando semen con y sin HBP (8.3% vs. 43.5%, respectivamente). También se observó diferencia significativa en el resultado total de gestaciones entre los grupos HBP y testigo (12.5% vs. 34%, respectivamente), sin encontrarse un aumento en los porcentajes de gestación del grupo HBP con respecto al grupo testigo. En la raza Nelore no se observó diferencia estadísticamente significativa al usar semen con o sin HBP, y tampoco hubo diferencias en el total de las gestaciones obtenidas en ambas razas ($P > 0.05$).

CUADRO 4
Porcentajes de gestación observados por raza.

Raza	SEMEN GRUPO TESTIGO			SEMEN GRUPO HBP			Total
	Hembras	Gestantes	%	Hembras	Gestantes	%	
BRAHMAN	23	10	43.5 ^a	24	2	8.3 ^b	12/47 (25.5%) ^{ns}
NELORE	27	7	25.9 ^{ns}	24	4	16.7 ^{ns}	11/51 (21.6%) ^{ns}
Total	50	17	34 ^a	48	6	12.5 ^b	23/98 (23.5%)

ab= Literales diferentes en las misma fila indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

ns= Indica diferencia estadística no significativa ($P > 0.05$).

En cuanto al efecto de la CC sobre los porcentajes de gestación (Cuadro 5), se puede observar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las hembras con CC 3-4 y 5-6 (26.3% vs. 21.6%, respectivamente). También se observa que no hubo un mayor porcentaje de gestación de las hembras con CC 3-4 ($P= 0.2753$) y CC 5-6 ($P= 0.095$) inseminadas con semen adicionado con HBPs.

CUADRO 5
Porcentajes de gestación observados por Condición Corporal.

CC	SEMEN GRUPO TESTIGO			SEMEN GRUPO HBP			Total
	Hembras	Gestantes	%	Hembras	Gestantes	%	
3-4	23	8	34.7 ^{ns}	15	2	13.3 ^{ns}	10/38 (26.3%) ^{ns}
5-6	27	9	33.3 ^{ns}	33	4	12.1 ^{ns}	13/60 (21.6%) ^{ns}
Total	50	17	34 ^a	48	6	12.5 ^b	23/98 (23.5%) ^{ns}

ab= Literales diferentes en las misma fila indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

ns= Indica diferencia estadística no significativa ($P > 0.05$).

DISCUSIÓN.

La adición de las proteínas ligadoras de heparina (HBP) en el semen bovino congelado a una dosis reducida no permitió obtener un porcentaje mayor de fertilidad con respecto al grupo testigo en este estudio. Estos resultados no concuerdan con lo mencionado por algunos autores como Bellin *et al.*⁵³ quienes al trabajar con monta directa de toros positivos al Antígeno Asociado a la Fertilidad (FAA) obtuvieron un aumento en los porcentajes de gestación del 9% y Sprott *et al.*⁴⁹ mediante inseminación artificial (IA) usando semen congelado de toros positivos al FAA y vacas con celos sincronizados, reporta un aumento del 15.9% al estar presente la FAA en el semen bovino de toros de carne. Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo ya que hubo una disminución estadísticamente significativa en los porcentajes de gestación del grupo HBP (12.5%) con respecto al grupo testigo (34%).

Los porcentajes de gestación obtenidos en este estudio al utilizar una concentración espermática de 10 millones de espermatozoides por pajilla para ambos grupos de semen (12.5% del grupo HBP vs. 34% del grupo testigo, $P > 0.05$) no concuerdan con un trabajo realizado por Álvarez⁶⁵, quien obtuvo un porcentaje de gestación del 40% en vaquillas sincronizadas e inseminadas con semen con HBPs y un 16% de gestaciones con semen sin HBPs, concluyendo que las HBPs mejoraron el porcentaje de gestación. Sin embargo, en éste último estudio se emplearon pajillas con una concentración espermática de 25 millones de espermatozoides para ambos grupos de semen. Estas diferencias podrían deberse a la reducción de concentración espermática que se utilizó en el presente trabajo, ya que se sabe que aun utilizando comúnmente una concentración espermática de 25 millones de espermatozoides por pajilla el porcentaje de fertilidad sigue siendo bajo debido a la variabilidad en la fertilidad y a las particularidades en el comportamiento reproductivo del ganado *Bos indicus*.

En este estudio se incluyeron novillas y vacas, los resultados muestran que no hay una diferencia estadística en el porcentaje de gestaciones entre novillas y vacas (15.6% novillas vs. 31.9% vacas; $P > 0.05$). También se observó que no se mejoraron los porcentajes de gestaciones de novillas y vacas al usar las HBPs. Estos resultados difieren de los observados por Kjelland *et al.*⁵⁴, quienes hicieron un estudio utilizando semen congelado bovino a dosis reducida (10×10^6 espermatozoides) y adicionado con FAA y TIMP-2 en una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de cada una, observando que las vaquillas tenían un menor porcentaje de gestaciones tanto al usar o no semen con HBPs, en comparación con las vacas, pero observando un aumento en el porcentaje de gestación de vacas y vaquillas que fueron inseminadas con el semen adicionado con HBPs, en comparación con las que se inseminaron con semen sin HBPs (41.4% vs. 27.1%; $P < 0.05$). Sin embargo, estos autores utilizaron vaquillas *Bos taurus* de raza Holstein, localizadas en un clima templado.

En un estudio realizado por Fernandes *et al.*⁷³ que tenía como finalidad identificar HBPs en el líquido seminal de toros de la raza Nelore, se identificaron proteínas de 15 hasta 63 kDa, de las cuales, las de 22 y 25 kDa habían sido encontradas previamente en toros *Bos taurus*. También se identificaron otras proteínas (39, 53, 58 y 63 kDa) que no habían sido descritas anteriormente y tal vez pueden ser específicas del líquido seminal de los toros *Bos indicus* o Nelore. Con esto se podría sugerir que además de las proteínas de 31 y 25 kDa (FAA y TIMP-2 respectivamente) adicionadas al semen en este trabajo se podrían adicionar algunas otras proteínas encontradas en el líquido seminal de toros Nelore, lo que podría mejorar los porcentajes de gestación en las hembras de raza *Bos indicus*.

Los porcentajes de gestación de éste trabajo pudieron estar influenciados por factores ajenos a las condiciones del semen, como son la sincronización y presentación de celos.

En este estudio se logró un porcentaje total de retención de dispositivos intravaginales (DIVs) del 97.9%, lo cual concuerda con un trabajo realizado por Solórzano *et al.*⁷⁴ quienes obtuvieron un porcentaje de retención del 97.7%, mencionando que el porcentaje de retención alcanzado por los DIVs, ya sean nuevos o reutilizados indican que su diseño y material de fabricación les permite anclarse bien en la vagina y no perder fuerza al reutilizarlo, añadiendo que el porcentaje de pérdida no debe exceder del 5%. Por lo tanto, en este trabajo el resultado de retención de DIVs se encontró dentro de los parámetros citados como aceptables.

Durante este estudio se observó que la mayor frecuencia de presentación de celos fue de las 3:30 a.m. a las 8:00 a.m., con 73 hembras mostrando celo entre estas horas, mientras que solo 19 lo presentaron en horarios de 9:00 a.m. a 14:00 p.m. También se observó que las hembras de raza Brahman presentaron un calor más uniforme en cuanto a horario (3:30 – 8:00 a.m.), en comparación con las hembras de raza Nelore, que presentaron celos en horarios variados (3:30 a.m.- 14:00 p.m.). Esta alta frecuencia de la presentación de celos en los horarios antes mencionados concuerda con un trabajo realizado por Aguirre *et al.*⁷⁵, quienes mencionan haber obtenido la mayor frecuencia de presencia de celos en vacas de raza Brahman en un horario de 5:00 a.m. a 8:00 a.m. En otro trabajo realizado por Góngora y Hernández⁷⁶, quienes trabajaron con novillas de raza Brahman y de ganado criollo Sanmartinero observaron que la mayor frecuencia de celos (72.1%) se presentaba entre las 5:00 a.m. y las 11:00 a.m. En otro estudio se observó que las condiciones ambientales habían afectado las características del celo en novillas Nelore, ya que las montas no se distribuían igualmente durante el tiempo de duración del celo sino que existían ciertos periodos de mayor o menor actividad sexual.⁷⁷ Es probable que la presentación de celos en el ganado Cebú en estos horarios pueda estar relacionada con la menor temperatura ambiental que se presenta en horas de la madrugada y de la mañana en condiciones de trópico.

Otros factores que pudieron haber afectado los resultados de este estudio son los ambientales y los nutricionales. Durante la realización de este estudio se presentaron temperaturas por arriba de los 33.2°C (temperatura máxima promedio para el estado de Tabasco, Servicio Meteorológico Nacional, 2010) ,⁷⁸ lo que pudo haber causado los bajos porcentajes de gestaciones. Esta elevada temperatura, acompañada de alta humedad relativa causa alteraciones de las constantes fisiológicas de las vacas, lo que provoca una menor manifestación de los signos del estro durante el día, haciendo difícil la detección de celos, ya que se presentan mayormente por la madrugada y la mañana, así como una disminución de la fertilidad y el estrés calórico también inhibe la ciclicidad, lo que afecta la presentación de la pubertad y el reinicio de la actividad ovárica.¹³ Cuando hay incrementos de temperatura se ha podido observar que vacas con estrés calórico de 37°C y con humedad del 38% tuvieron una reducción en el peso y talla del producto durante la preñez temprana, además se observan menores tasas de preñez, por lo que los efectos del estrés calórico durante la gestación temprana pueden tener resultados dramáticos en el reconocimiento materno de la gestación e implantación.⁷⁹⁻⁸¹ Además Hernández *et al.*⁸² sugieren que los embriones que no sufran estrés calórico en el día 4 posterior a la inseminación tienen desarrollo similar a los embriones no expuestos a este estrés. Esto puede indicar que si en el día 4 después de la inseminación se presentaron temperaturas elevadas y las vacas sufrieron de estrés calórico, esto pudo haber afectado los porcentajes de gestación obtenidos. Es sabido que el estrés calórico llega a afectar el comportamiento estral de las hembras aun siendo ganado adaptado al trópico.⁷⁵

Con referencia al factor nutrición, el presente trabajo se desarrolló en el mes de julio, cuando había buena disponibilidad de pastos en el rancho en donde se llevó a cabo el estudio. Sin embargo, la disponibilidad no necesariamente asegura una buena calidad de pastos, por lo que es recomendable analizar la calidad de los mismos, debido a que se ha encontrado que la carencia o desequilibrio de minerales en el suelo se refleja en el valor nutritivo de los pastos y esto es una de las causas de la baja productividad y de los problemas de reproducción del

ganado vacuno.⁸³ Esto se manifiesta en un porcentaje de concepción no mayor a 45%, un porcentaje de abortos que puede alcanzar al 10%, y una edad y peso al primer servicio y al primer parto que están fuera de los valores considerados como eficientes para una ganadería productiva, además de una producción de ovocitos de menor calidad y cuerpos lúteos disfuncionales.^{84,85}

Como se ha mencionado anteriormente, la CC tiene efectos sobre las funciones reproductivas (secreción de gonadotropinas, la concentración plasmática de progesterona, la función ovárica, la calidad del ovocito, del embrión, la involución uterina y los porcentajes de concepción).¹¹ Algunos autores como Morrison *et al.*⁸⁶ y Hess *et al.*⁸⁷ han determinado que la CC al parto ≥ 5 (escala 1 a 9) es ideal en vacas de carne, debido a que en ésta condición las vacas son capaces de resistir una pérdida de peso posparto sin disminuir significativamente los porcentajes de gestación. También se ha reportado la relación entre la CC y el desarrollo folicular, ya que en un trabajo realizado por Rubio *et al.*⁸⁸ en vacas Brahman (Veracruz, México), los resultados indicaron que a medida que una vaca recupera CC se producirá la formación de folículos de diferentes tamaños, seguida por estro y ovulación. Si la CC es baja, se forman muchos folículos pequeños, particularmente aquellos <4 mm y por lo tanto, hay un retraso en el inicio del estro. Otros autores como Sá Filho *et al.*⁸⁹ mencionan que la CC es un factor de confianza para predecir la tasa de preñez en vacas Nelore bajo un protocolo IATF basado en P4, BE, PGF2 α , Cipionato de Estradiol y destete temporal. Sin embargo, en otros estudios no hallaron efecto de la CC (3.0 a 4.0 y 2.0 a 3.5, respectivamente, en escala de 5 puntos) sobre la tasa de preñez de vacas Nelore tratadas con un protocolo IATF similar.^{90,91} Así como en el estudio anterior, en el presente trabajo no se encontró un efecto significativo de la CC sobre los porcentajes de gestación, en los animales que se encontraban en una rango de CC entre 3 a 4 y 5 a 6 (en una escala de 1 a 9) esta les permitió a las hembras tener un desarrollo folicular adecuado y una buena expresión de celos; sin embargo, en este estudio se obtuvo una disminución de los porcentajes de fertilidad (23.5%).

Un factor más que debe tomarse en cuenta que pudo haber influenciado los porcentajes de gestación de éste trabajo pudo ser de tipo hormonal. El porcentaje de gestación en este trabajo tiene relación con lo reportado por Cutaia *et al.*⁹², quienes mencionan que los altos niveles de P₄ durante el tratamiento de sincronización suprimen la frecuencia y magnitud de los pulsos de LH, lo cual afecta el crecimiento del folículo dominante y la ovulación. Esto tiene mayor importancia en vaquillas cebú o cruce con cebú, en las cuales se ha demostrado que tienen menor capacidad para metabolizar la P₄ liberada por los dispositivos. Además, Bó *et al.*⁷ informaron de la existencia de concentraciones menores de P₄ para el ganado *Bos indicus*, en comparación con *Bos taurus*, pero no indican los niveles exactos.

La exposición de las vacas a agentes estresantes (altas temperaturas y alta humedad ambiental, forrajes de mala calidad, entre otros) afecta la frecuencia y la amplitud de los pulsos de GnRH y LH, retardando la onda preovulatoria de LH. Esto tiene como consecuencia una disminución en la expresión del estro y en la incidencia de una ovulación normal en el ganado bovino.⁷

CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que la adición de las proteínas FAA y TIMP-2 al semen bovino congelado en dosis reducida, no mejoró los porcentajes de gestación en un programa de inseminación artificial en ganado *Bos indicus* en el trópico.

Los altos porcentajes de retención de dispositivos intravaginales (DIVs) que se obtuvieron en este estudio comprueban que los dispositivos intravaginales son una excelente herramienta para ser empleada en protocolos de sincronización en este tipo de ganado y bajo las condiciones de trabajo presentes en el trópico.

Los porcentajes de presentación de celos que se obtuvieron en este estudio sugieren que el uso de PGF 2α y Benzoato de Estradiol para la sincronización y la presentación de celos fue altamente exitoso en las hembras que se utilizaron en este trabajo, y bajo las condiciones que estuvieron presentes durante el tiempo que duró el proyecto de investigación.

En el presente estudio no se observó efecto de la condición corporal (CC) sobre el número de hembras que presentaron celos y sobre el número de hembras gestantes. Sin embargo, se debe considerar que la CC tal vez sea un factor determinante del porcentaje de gestación bajo protocolos de IA. Por lo tanto, antes de iniciar un tratamiento de sincronización de las ondas foliculares y de los celos, debe evaluarse la CC y en caso de que esta sea inadecuada es recomendable suplementar el ganado, a fin de que los parámetros reproductivos no se vean altamente afectados por este factor y logren obtenerse resultados positivos.

PERSPECTIVAS.

No hay suficiente información sobre la adición de la FAA y TIMP-2 al semen bovino congelado utilizado en programas de IA en el trópico mexicano, por lo que se sugiere realizar más estudios con respecto a esta línea de investigación, ya que las HBPs juegan un papel importante en la capacidad fertilizante de los espermatozoides bovinos.

Es importante seguir avanzando en la investigación de los factores estresantes relacionados con el clima, como lo es el estrés calórico, ya que a pesar de que los animales de razas cebuínas estén adaptados a climas de altas temperaturas estos de todas formas se ven afectados por este factor, aunque no en la misma magnitud como se ven afectadas las razas tipo *Bos taurus*. Así como es importante difundir y promover el uso de sombreaderos, ya sean de tipo natural o artificial en estas regiones tropicales, los cuales contribuyen a disminuir el estrés que sufre el ganado durante el día y especialmente durante las estaciones del año donde las temperaturas alcanzan su mayor elevación.

REFERENCIAS.

1. La Producción de Carnes en México 2010. Claridades Agropecuarias. Noviembre 2010; 207:19-33. Consultado en febrero de 2011. Disponible en: <http://www.sagar.gob.mx>
2. Anta JE. Análisis de la información publicada sobre la eficiencia reproductiva del ganado bovino en el trópico mexicano (Tesis de licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. 1987.
3. Livas FC. Estrategias de Alimentación para Ganado Bovino en las Regiones Tropicales. Memorias del XXXIII Congreso Nacional de Buiatría. 2009 agosto 6-8; Tuxtla Gutiérrez (Chiapas). México: 2009; 58-65.
4. Forero LE. Aspectos Reproductivos del Ganado *Bos Indicus*: Sincronización de Celos. 2005. Consultado en febrero de 2011. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar
5. Asprón MA. Curso de Actualización-Manejo Reproductivo del Ganado Bovino. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York, EEUU. 2004. Consultado en febrero de 2011. Disponible en: www.ivis.org
6. Bó GA, Baruselli PS. Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en el Ganado Bovino en Regiones Subtropicales y Tropicales. Avances en la Ganadería doble propósito. Maracaibo. Venezuela: Fundación Girarz, 2002; XXXI: 499-514.
7. Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. Anim Reprod Sci. 2003; 78:307-326.
8. Bó, GA, Cutaia, L. Estado del arte en IATF: factores que afectan sus resultados. 1998. Consultado en febrero de 2011. Disponible en:

http://www.abspecplan.com.br/iatf/artigos_tecnicos/1/Estado%20da%20arte%20en%20IATF.pdf

9. Bó GA, Cutaia L, Chesta P, Balla E, Picinato D, Peres L, Maraña D, Avilés M, Menchaca A, Veneranda G, Baruselli PS. Implementación de Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Rodeos de Cría de Argentina. 6° Simposio Internacional de Reproducción Animal. 2005 junio 24-26; Córdoba, Argentina. 2005; 97-128.
10. Frasinelli CA, Casagrande, HJ, Veneciano, JH. La condición corporal como herramienta de manejo en rodeos de cría bovina. INTA. Información Técnica; EEA San Luis, Argentina. 2004; 168: 1-17.
11. Correa AO, Uribe LFV. La Condición Corporal como Herramienta para Pronosticar el Potencial Reproductivo en Hembras Bovinas de Carne. Rev. Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, Colombia. 2010; 63(2): 5607-5619.
12. Villagómez AME, Castillo RH, Villa-Godoy A, Román PH, Vásquez PC. Influencia estacional sobre el ciclo estral y el estro en hembras cebú mantenidas en clima tropical. *Téc Pecu Méx* 2000; 38 (2): 89-103.
13. Córdova IA, Pérez GJF. Indicadores reproductivos de bovinos en el trópico mexicano y factores que lo determinan. *Med Vet* 2002; 19 (3): 47-56.
14. Basurto CH, Martínez AA, Gutiérrez VI. Factores que alteran la fertilidad de los servicios de inseminación artificial en vacas F1 (Holstein x Cebú) en el trópico húmedo. *Vet Méx* 1997; 28 (2): 109-116.
15. Pérez PH, Sánchez del Real C, Gallegos JS. Anestro postparto y alternativas de manejo del amamantamiento en vacas de doble propósito en trópico. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* 1997; 16 (2): 2001.

16. Blanco D, Ramírez IE, Fonte L. Técnicas para la resolución del anestro verdadero en bovinos de aptitud cárnica. 2008. Consultado en febrero del 2011. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308.html>
17. Bavera GA. Cursos de Producción Bovina de Carne. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba. Argentina. 2005; 2-8.
18. Wright IA, Rhind SM, White TK. A note on the effects of pattern of food intake and body condition on the duration of the postpartum anoestrus period in beef cows. *Anim. Prod.* 1992; 54: 143-146.
19. Wettemann RP, Lents CA, Ciccioli NH, White FJ, Rubio I. Nutritional and suckling mediated anovulation in beef cows. *Journal of Animal Science* 2003; 81 (E Suppl 2): E48-E59.
20. Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JM. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*. 1997; 47(8):1489-505.
21. Way A, Lester C, Griel JR, Killian G. Effects of Accessory Sex Gland Fluid on Viability, Capacitation, and the Acrosome Reaction of Cauda Epididymal Bull Spermatozoa. *Journal of Andrology* 2000; 21: 213-219.
22. Lane M, Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Heparin and High-Density Lipoprotein Mediate Bovine Sperm Capacitation by Different Mechanisms. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 169-175.
23. Nauc V, Manjunath P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.* 2000; 63:1058-1066.

24. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1250-1258.
25. Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. *Biol. Reprod.* 2006; 75:501-507.
26. Thérien I, Bleau C, Manjunath P. Phosphatidylcholine-Binding Proteins of Bovine Seminal Plasma Modulate Capacitation of Spermatozoa by Heparin. *Biol. Reprod.* 1995; 52:1372-1379.
27. Salois D, Ménard M, Paquette Y, Manjunath P. Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning and Tissue Expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: Phosphatidylcholine and Heparin-Binding Proteins of Bovine Seminal Plasma. *Biol. Reprod.* 1999; 61:288-297.
28. Ignatz GG, Cho MY, Suarez SS. Annexins are Candidate Oviductal Receptors for Bovine Sperm Surface Proteins and Thus May Serve to Hold Bovine Sperm in the Oviductal Reservoir. *Biol. Reprod.* 2007; 77:906-913.
29. Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Spermatology.* 2007; 65:217-226.
30. Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Töpfer-Petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin-and gelatin-binding capabilities. *Biochem. J.* 1995; 310:615-622.

31. Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius H, Töpfer-Petersen E. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 35:37-43.
32. Leblond E, Desnoyers L, Manjunath P. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 34:443-449.
33. Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 1(1):39-49.
34. Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol. Reprod.* 2004; 1(1):656-661.
35. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-Binding Proteins from Seminal Plasma Bind to Bovine Spermatozoa and Modulate Capacitation by Heparin. *Biol. Reprod.* 1990; 42:899-915.
36. McCauley TC, Bellin ME, Ax RL. Localization of a Heparin-Binding Protein to Distinct Regions of Bovine Sperm. *J. Anim. Sci.* 1996; 74: 429-438.
37. Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 1997; 57:1080-1088.
38. Marks JL, Ax RL. Relationship of non-return rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. *J. Dairy Sci.* 1985; 68:2078-2082.

39. Thérien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol. Rep. Dev.* 2005; 71(1):97-106.
40. Lee CN, Ax RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 1984; 67:2006-2009.
41. Lee CN, Clayton MK, Bushmeyer SM, First NL, Ax RL. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 1986; 63:861-867.
42. Varner DD, Forrest DW, Fuentes F, Taylor TS, Hooper RN, Brinsko SP, Blanchard TL. Measurements of glycosaminoglycans in follicular, oviductal and uterine fluids of mares. *J. Reprod. Fert.* 1991; 44:297-306.
43. Miller DJ, Ax RL. An Improved for Assay for Measuring Heparin Binding to Bull Sperm. *J. Dairy Sci.* 1988; 71:239-244.
44. Risopatrón J, Catalán S, Sepúlveda N, Sánchez R. Efecto de Diferentes Concentraciones de Heparina sobre la Capacitación Espermática *in vitro* en Canino. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2005; XV(6): 528-535.
45. Bellin ME, Hawkins HE, Oyarzo JN, Vanderboom RJ, Ax RL. Monoclonal Antibody Detection of Heparin-Binding Proteins on Sperm Corresponds to Increased Fertility of Bulls. *J. Anim. Sci.* 1996; 74:173-182.
46. Bellin ME, Hawkins HE, Ax RL. Fertility of Range Beef Bulls Grouped According to Presence or Absence of Heparin-Binding Proteins in Sperm Membranes and Seminal Fluid. *J. Anim. Sci.* 1994; 72:2441-2448.

47. Nass SJ, Miller DJ, Viner MA, Ax RL. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to cauda epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 25:237-246.
48. McCauley TC, Dawson GR, Oyarzo JN, McVicker J, Marks S, Ax RL. Developing and validating a lateral-flow cassette for fertility diagnostics in bulls: An IVD detects the presence of a fertility-associated protein in bull semen to predict fertility. 2004. Consultado en abril del 2010. Disponible en: <http://www.devicelink.com/ivdt/archive.html>
49. Sprott LR, Harris MD, Forrest DW, Young J, Oyarzo JN, Bellin ME, Ax RL. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. *J. Anim. Sci.* 2000; 78: 795-798.
50. McCauley TC, Zhang HM, Bellin ME, Ax RL. Identification of a Heparin-Binding Protein in Bovine Seminal Fluid as Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2. *Mol. Reprod. Dev.* 2001; 58: 336-341.
51. Ax RL, McCauley TC, Dawson GR, Daley C, Daley D. Heparin-Binding Proteins as an Indicator of Bull Potency. Annual Beef & Range Field Day; 2004 april 15; University of California. Browns Valley, California. USA.
52. McCauley TC, Zhang H, Bellin ME, Ax RL. Purification and Characterization of Fertility-Associated Antigen (FAA) in Bovine Seminal Fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 54: 145-153.
53. Bellin, ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Zhang H, Smith RG, Forrest DW, Sprott LR, Ax RL. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *Journal of Animal Science.* 1998; 76: 2032-2039.
54. Kjelland ME, McCauley TC, Lenz RW, Evans KM, Ax RL, Moreno J. Cell Therapeutics: Adsorption of Recombinant FAA and TIMP-2 Proteins by Sperm.

Curso Internacional: Tecnologías Innovativas en Mejoramiento Genético para una Ganadería Sustentable. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas e Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva INDES-CES. 2010. Chachapoyas, Perú.

55. Calvete JJ, Varela PF, Sanz L, Romero A, Mann K, Töpfer-Petersen E. A procedure for the large scale isolation of major bovine seminal plasma proteins. 1996. *Protein Expr. Purif.* 8: 48-56.
56. DeClerck YA, Yean TD, Ratzkin BJ, Lu HS, Langley KE. Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1989; 264 (29):17445-17453.
57. Baumgart E, Lenk SV, Loening SA, Jung K. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in human seminal plasma and their association with spermatozoa. *Int. J. Androl.* 2002; 25(6):369-371.
58. Shimokawa KI, Katayama M, Matsuda Y, Takahashi H, Hara I, Sato H. Complexes of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human seminal plasma. *J. Androl.* 2003; 24(1):73-77.
59. Siu MK, Cheng CY. Interactions of proteases, protease inhibitors, and the beta1integrin/laminin gamma3 protein complex in the regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis. *Biol. Reprod.* 2004; 70(4):945-964.
60. Metayer S, Dacheux F, Dacheux JL, Gatti JL. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol. Reprod.* 2002; 66(5):1219-1229.
61. Dawson GR. Localization on sperm, quantification and molecular features of two seminal proteins (PhD Dissertation). Arizona, USA: University of Arizona; 2005.

62. Boone TC, Johnson MJ, De Clerck YA, Langley KE. cDNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 87:2800-2804.
63. Dawson GR, Bellin ME, Oyarzo JN, Hawkins HE, Arns MJ, Ax RL. Presence of TIMP-2 on sperm corresponds to fertility of range beef bulls. 27th American Society of Andrology Meeting. Seattle, WA. 2002.
64. Mills B. The fertility protein. Angus Journal. 2002; 46-47.
65. Álvarez H. Efecto de la adición de dos proteínas ligadoras de heparina al semen bovino congelado, en un programa de inseminación artificial en el trópico. Tesis Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2011.
66. Estado de Tabasco. Enciclopedia de los Municipios de México. Consultado en mayo de 2011. Disponible en: <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/tabasco/mpios/27007a.htm>
67. Wagner, J.J., K.S. Lusby, J.W. Oltjen, J. Rakestraw, R.P. Wettemann and L.E. Walters. Carcass composition in mature Hereford cows: estimation and effect on daily metabolizable energy requirement during winter. J. Anim. Sci. 1988; 66(3): 603-612.
68. Sorensen, AM Jr. Repro Lab: a laboratory manual for animal reproduction. American Press, Boston, Massachusetts, USA. 1979; 4^a ed. 59-65.
69. Lenz RW, Zhang H, Oyarzo JN, Bellin ME, Ax RL. Bovine Fertility-Associated Antigen (FAA) and a Recombinant Segment of FAA Improve Sperm Function. SSR. 2000; abstract: 80. Consultado en marzo de 2011. Disponible en: <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/ssr2000/abstracts/ROY-4-2-9.html>

70. Zhang H, Bellin ME, Ax RL. Cloning and Expression of Recombinant Bovine Tissue Inhibitor. Plant & Animal Genome IX Conference. 2001. Enero 13-17; San Diego, California. EEUU.
71. Rae, DO. Bovine estrus: tools for detection and understanding. Factors affecting calf crop: Biotechnology of Reproduction. Fields, MJ, RS, Sand, JV, Yelich. Ed CRC Press LLC, Florida, EEUU. 2002; 7-20.
72. R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponible en <http://www.R-project.org>.
73. Fernandes CE, Ferreira F, Souza-Neto JA, Martins PR. Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nellore bulls. Ciencia Rural. 2008. Consultado en febrero de 2011. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx>
74. Solórzano HC, Hernández MJ, Galina HC, Villa GA, Vera AH, Romo GS. Reutilización de un dispositivo liberador de progesterona (CIDR-B) para sincronizar el estro en un programa de transferencia de embriones bovinos. Téc. Pecu. Méx. 2008; 46 (2): 119-135.
75. Aguirre G. Pardo C, Góngora A. Inicio del celo, tasa de gestación y relación del tiempo de inseminación con los niveles de progesterona en vacas Brahman. Rev. MVZ Córdoba. Universidad de Córdoba. Montería, Colombia. 2006; 11 (1): 766-772.
76. Góngora A, Hernández A. Comportamiento sexual, duración del estro y el ciclo estral en novillas criollas sanmartineras y brahman del piedemonte llanero colombiano. Livestock Research for Rural Development. 2006; 18.
77. Rocha J. Sincronizacao hormonal da onda folicular e do estro em novilhas de corte mesticas monitoradas por radio telemetria. Tesis Doctoral. Faculda de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidad de Sao Paulo. Sao Paulo, Brasil 2000.

78. Servicio Meteorológico Nacional. Temperaturas máximas promedio (Tabasco). México. CONAGUA. 2010.
79. Biggers BG, Geisert RD, Wetteman RP, Buchanan DS. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *Journal of Animal Science*. 1987; 64: 1512-1518.
80. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008; 43 (Suppl 2): 260-267.
81. O'Brien MD, Rhoads RP, Sanders SR, Duff GC, Baumgard LH. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 2010; 38: 86-94.
82. Hernández CJ, Chase Jr. CC, Hansen PJ. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano and Angus breeds. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87: 53-58.
83. Salamanca A. Suplementación de minerales en la producción bovina. Universidad Cooperativa de Colombia, Arauca. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. *Revista Electrónica de Veterinaria* 1695-7504. 2010; 9 (11). Consultado en marzo de 2011. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090910.html>
84. Garmendia J. Los minerales en la Reproducción Bovina. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay. Venezuela. 2006. Consultado en abril de 2011. Disponible en: <http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/minerales.pdf>
85. Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science*. 2006; 96: 297-311.

86. Morrison DG, Spitzer JC, Perkins JL. Influence of prepartum body condition score change on reproduction in multiparous beef cows calving in moderate body condition. *Journal of Animal Science*. 1999; 77(5): 1048–1054.
87. Hess BW, Lake SL, Scholljegerdes EJ, Weston TR, Nayigihugu V, Molle JDC, Moss GE. Nutritional controls of beef cow reproduction. *Journal of Animal Science*. 2005; 83: E90–E106.
88. Rubio I, Castillo E, Soto R, Alarcón F, Murcia C, Galina CS. Postpartum follicular development in Brahman cows under two stocking rates. *Tropical Animal Health and Production*. 2010; 42(3): 539-545.
89. Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*. 2009; 72(2): 210-218.
90. Meneghetti M, Sá Filho OG, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology*. 2009; 72(2): 179–189.
91. Pinheiro VG, Souza AF, Pegorer MF, Satrapa RA, Ereno RL, Trinca LA, Barros CM. Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum Nelore cows. *Theriogenology*. 2009; 71(3): 519-524.
92. Cutaia LE, Peres LC, Pincinato D, Chesta PM, Ramos M, Bó GA. Programas de sincronización de celos en vaquillonas de carne: Puntos críticos a tener en cuenta. Primer Curso de reproducción bovina Syntex. Villahermosa, Tabasco, México. 2010.