



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA
SALUD ANIMAL

**DESARROLLO EMBRIONARIO Y CONCENTRACIONES SÉRICAS
DE PROGESTERONA, INSULINA E IGF-I EN VACAS *BOS INDICUS*
SUPEROVULADAS TRATADAS CON LA HORMONA
BOVINA DEL CRECIMIENTO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

CLAUDIA GRISEL VELAZQUILLO MARTÍNEZ

TUTOR:

Luis Alberto Zarco Quintero
FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Joel Hernández Cerón
FMVZ-UNAM

Ma. Teresa Sánchez Torres Esqueda
COLPOS-CHAPINGO

México D.F. Agosto 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A Dios. por estar en mi vida, por llenarme de bendiciones y hacerme una mujer afortunada al tener a personas maravillosas que me aman y a las que amo con todo mi corazón. Por permitirme alcanzar este logro profesional y darme cada día la oportunidad de vivir. Con todo el corazón...gracias.

A mis padres. Yolanda e Irineo, por darme la vida y estar siempre a mi lado apoyándome, cuidándome, aconsejándome, dándome su amor. Por ser mi principal ejemplo de trabajo y dedicación. Gracias, porque sin ustedes no sería la mujer que soy hoy. Los amo con toda mi vida.

A mis hermanitos. Laura y José Eduardo Velazquillo, por estar siempre conmigo, por que no sólo son mis hermanos, son mis amigos de toda la vida. Gracias por todo su amor, su apoyo, por las risas, las peleas, los consejos...siempre estaremos juntos ¡Los amo mucho!

A mi abue María. Por estar con nosotros siempre, por cuidarnos y apoyarnos en cualquier situación. Por ser para mí uno de los más grandes ejemplos de trabajo y superación en la vida. Gracias por ser para mí como una segunda mamá. ¡La quiero mucho abue!

A César Yedid Rosales Cortés. Mi amor y compañero de vida. Porque tú has sido un gran apoyo para dar este paso. Gracias por llegar a mi vida, por ser un ejemplo para mí de trabajo y pasión a la medicina veterinaria. Por tus enseñanzas, tus consejos, por cada maravilloso momento a tú lado. Eres una bendición para mí y primero Dios lograremos todas las metas y sueños que tenemos, pero siempre juntitos. ¡Te amo con todo mi corazón!

A mis sobrinos. Pamelita y Gabrielito Velazquillo. Por llegar a nuestras vidas y llenarnos de alegría y bendiciones. Ustedes son un gran impulso para ser mejores, no sólo a mí, sino para toda la familia. ¡Los quiero mucho!

A la familia Rosales Cortés. Por ser un ejemplo para mí de trabajo, unión familiar y calidad humana. Gracias por permitirme entrar en su hogar, por todo el cariño y el respeto que he recibido de ustedes. Gracias por ser las maravillosas personas que son... ¡Los quiero mucho!

A Sofía Chávez. Gracias por tu amistad amiga, por todo tu apoyo durante la primera etapa de este proyecto y todo este tiempo. Por estar conmigo y nunca dejarme sola, ni en los momentos más adversos. Por todas las risas, las pláticas, los consejos, las lagrimas y por cocinar tan rico. Te quiero mucho, siempre seremos amigas Chofis.

A Alejandra Sánchez. Mí querida amiga de tantos años, por estar siempre conmigo. Afortunada soy de tener la amistad de un gran ser humano como tú. Gracias por tenerme siempre presente como yo a tí, por las pláticas, tu apoyo, los viajes, las aventuras, las risas, los consejos, las lagrimas, por estar conmigo en cada momento importante de mi vida. Te quiero muchísimo Ale y aún nos queda mucho camino por recorrer juntas y sin importar el lugar siempre seremos amigas.

A mis seres queridos. A mis familiares (Abuelita Carmen, tía Elena, Mónica Rodríguez, primos, sobrinos) y amigos, por estar conmigo a cada paso que doy. Por estar en mi vida y hacer de mí una mujer afortunada por tener a personas tan maravillosas como ustedes. Gracias por que con cada sonrisa, platica y consejo que he recibido de ustedes, he podido estar el día de hoy aquí. ¡Los quiero muchísimo!

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Universidad Nacional Autónoma México, a la cuál le debo mi formación académica, profesional y humanística. Para mi es un honor haber sido estudiantes de la máxima casa de estudios de México y ahora formar parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División de Estudios de Posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo al realizar mis estudios de maestría.

A mi honorable comité tutorial, formado por los Doctores Luis Alberto Zarco Quintero, Joel Hernández Cerón y María Teresa Sánchez Torres Esqueda, por su tiempo, paciencia y conocimientos dedicados a este proyecto. Honrada y privilegiada me siento por haber recibido su tutoría.

Un especial agradecimiento al Dr. Luis Alberto Zarco Quintero, por su apoyo durante la licenciatura y maestría. Para mí es un honor haber recibido su tutoría, todo su apoyo y conocimientos.

Al MVZ MC Eduardo Posadas Manzano por facilitar las instalaciones y los animales para este trabajo. Por su apoyo y todo este tiempo de trabajo, muchas gracias Doctor.

Al Departamento de Reproducción Animal por facilitarme la determinación de los hormonales en el laboratorio y en especial a Anita Rodríguez por su paciencia, asesoría y apoyo.

Al MVZ MC Javier Hernández Ignacio y al MVZ MPA Tomas Meraz por su apoyo en la parte experimental de este trabajo, por sus consejos, tiempo y paciencia. Sin su apoyo no habría sido posible.

A laboratorios Tornel, al Ing. Luis Bravo Tornel por facilitar los hormonales para este proyecto de investigación y estar siempre a favor del crecimiento académico y profesional.

A laboratorios Brovel, y en especial al M. MVZ. Rabindranath Rivera Álvarez por facilitar los hormonales utilizados por este proyecto.

A los miembros de mi honorable jurado por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis. Gracias por aportar todos sus conocimientos y tiempo en la revisión de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS	7
4. REVISIÓN DE LITERATURA	8
4.1 Superovulación en ganado <i>Bos indicus</i>	8
4.2. Somatotropina Recombinante Bovina (rbST).....	9
4.2.1 Origen y estructura de rbST.....	9
4.2.2 Efecto de somatotropina bovina en el organismo.....	9
4.2.3 Efecto de somatotropina bovina en la reproducción.....	11
4.3 Efecto de rbST en la respuesta superovulatoria.....	12
4.3.1 Efecto de rbST sobre la tasa de ovulación.....	12
4.3.2 Efecto de rbST sobre el número y calidad embrionaria.....	13
4.3.3 Efecto de rbST sobre el desarrollo embrionario.....	14
4.4 Función de la progesterona en la reproducción.....	14
4.5 Función de IGF-I en la reproducción.....	15
4.6 Función de la insulina en la reproducción.....	16
4.7 Efecto de rbST sobre los niveles séricos de insulina.....	17
4.8 Efecto de rbST sobre los niveles séricos de IGF-1.....	17

4.9 Efecto de rbST sobre los niveles séricos de progesterona.....	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
5.1 Localización.....	20
5.2. Animales y grupos experimentales.....	20
5.3 Alimentación.....	20
5.4 Trabajo experimental.....	20
5.5 Muestreo sanguíneo y procesamiento de muestras.....	23
5.6 Análisis estadístico.....	24
6. RESULTADOS.....	25
7. DISCUSIÓN.....	30
8. CONCLUSION.....	39
9. LITERATURA CITADA.....	40

RESUMEN

Desarrollo embrionario y concentraciones séricas de progesterona, insulina e IGF-1 en vacas *Bos indicus* superovuladas tratadas con la hormona bovina del crecimiento.

Velazquillo M.C.G., Zarco Q.L.A., Hernández C.J., Sánchez T.E.M.T. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de somatotropina bovina recombinante (rbST) durante la inseminación, sobre la calidad y el desarrollo de embriones de vacas donadoras *Bos indicus*, así como su efecto sobre los niveles séricos de progesterona, insulina e IGF-1. Se utilizaron 12 vacas divididas aleatoriamente en dos grupos experimentales: Grupo rbST (n=7) y grupo testigo (n=5). El momento de la aplicación de 500 mg de rbST durante la inseminación en el estro superovulatorio se consideró como el día 0. Las vacas fueron presincronizadas, aplicando 2 dosis de 25 mg de Prostal los días -41 y -27 del programa de superovulación. El día -13 se aplicaron 25 mg de Prostal y un dispositivo intravaginal de liberación prolongada CIDR, el día -7 se les aplicó 300 µg de GnRH. En el programa de superovulación se aplicaron entre los días -6 y -2 un total de 8 dosis decrecientes de FSH por vía IM a intervalo de 12 horas. El día -3.5 además de la dosis de FSH se aplicaron 25 mg de Lutalyse, el día -2 se retiró el CIDR y se aplicaron 25 mg de Prostal y el día -1 se aplicaron 300 µg de Ovalyse. A partir del día -1 se realizó la detección de celos. Las vacas fueron inseminadas 12 y 24 horas después del inicio del estro el día 0. Al grupo rbST se le administró una inyección de 500 mg de rbST vía subcutánea en el pliegue anocaudal durante la primera inseminación, 7 días después se realizó la recuperación de los embriones por la técnica no quirúrgica. Los embriones obtenidos se clasificaron de acuerdo a la etapa y calidad embrionaria. Se realizó un muestreo sanguíneo a partir del día 0, continuando cada tercer día hasta el día 7. Se determinaron las concentraciones séricas de progesterona (radioinmunoanálisis; RIA) y las concentraciones séricas de IGF-1 e insulina (enzimo inmunoensayo; ELISA). Las concentraciones séricas de progesterona, IGF-1 e insulina de las donadoras se compararon mediante un análisis de varianza; mediante Ji cuadrada se comparó el número de embriones recolectados por grupo y su distribución en las distintas categorías de calidad y grado de desarrollo. El porcentaje de recuperación embrionaria (embriones recuperados/ cuerpos lúteos) fue estadísticamente superior en las vacas del grupo rbST (70.1%) que en el grupo testigo 25.9% (p<0.01). El porcentaje de embriones transferibles fue mayor en el grupo rbST (68.9%) que en el grupo testigo (14.3%; p<0.01). El porcentaje de embriones degenerados fue del 50% para el grupo testigo y 0% para el grupo rbST. El grupo testigo presentó un 42.8% de blastocistos iniciales comparado con el grupo rbST con 31.9% (p<0.05). El porcentaje de blastocistos maduros fue mayor en el grupo rbST (55.3%) que el grupo testigo (7.1%; p<0.05). El porcentaje de blastocistos expandidos fue del 12.8% en el grupo rbST comparado con el grupo testigo con 0% (p<0.05). Las concentraciones de progesterona fueron similares hasta el día 3 del muestreo, pero el día 5 y 7 del muestreo fueron mayores en el grupo rbST (p<0.05). Las concentraciones séricas de insulina fueron similares entre grupos hasta el día 3 del muestreo, pero hubo diferencias significativas en los días 5 y 7 (p< 0.05). Las concentraciones séricas de IGF-1 permanecieron similares en ambos grupos casi todos los días de muestreo, excepto en el día 3, cuando el grupo rbST presentó un incremento diferente (p<0.05). Los

resultados del presente estudio sugieren que la aplicación de 500 mg de rbST al momento de la inseminación artificial en un programa de superovulación en ganado *Bos indicus*, disminuye la mortalidad embrionaria, incrementar el desarrollo embrionario, el porcentaje de recuperación y el porcentaje de embriones trasferibles. Estos efectos están asociados con un incremento significativo de los niveles de progesterona, insulina e IGF-1 de manera transitoria.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, *Bos indicus*, superovulación, hormona bovina del crecimiento.

ABSTRACT

Embryonic development and serum progesterone, insulin and IGF-1 in superovulated *Bos indicus* cows treated with bovine growth hormone. Velazquillo M.C.G., Zarco Q.L.A.,

Hernández C.J., Sánchez T.E.M.T. The aim of this study was to evaluate the effect of administration of recombinant bovine somatotropin (rbST) during insemination on the quality and embryonic development of *Bos indicus* donor cows and its effect on serum levels of progesterone, insulin and IGF-1. 12 Zebu cows were randomly divided in two experimental groups: Group rbST (n=7) and control group (n=5). The timing of the injection for the 500 mg rbST at insemination was considered day 0. Cows were presynchronized, applying 2 doses of 25 mg Prostal in days -41 and -27 of the superovulation program. Day -13 Prostal (25 mg) and sustained release intravaginal device (CIDR) were applied and day -7 were administered 300 µg of GnRH. In the superovulation program, between days -6 and -2 a total of 8 decreasing doses of intramuscularly FSH were applied with a 12 hours interval. The day -3.5 in addition of the FSH dose, 25 mg of Prostal were applied. In day -2 the CIDR was removed and applied Prostal (25 mg) and in day -1.5 were applied 300 µg of Ovalyse. From day -1, heat detection was performed. The cows were inseminated 12 and 24 hours after the onset of estrus. rbST group was given an injection of 500 mg of rbST subcutaneously in anocaudal fold during the first insemination; 7 days after, the recovery of embryos by non-surgical technique was performed. The embryos were classified according to the stage and quality. In the sampling the day to application of 500 mg was considered as day 0, continuing every other day until day 7. Progesterone concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA); concentrations of IGF-1 and insulin were determined by enzyme-linked immunoassay (ELISA). The concentrations of progesterone, IGF-1 and insulin of the donors were compared by analysis of variance; nonparametric tests were used to compare the number of embryos per group and their distribution in different quality and level of development. The embryo recovery rate (recovered embryos/ corpora lutea) was statistically higher in cows treated with rbST (70.1%) than in the control group 25.9% ($p < 0.01$). The percentage of transferable embryos was higher in the group rbST (68.9%) than in the control group (14.3%; $p < 0.01$). The control group showed 50% embryos degenerated compared with 0% rbST. The group control showed 42.8 % initial blastocyst compared with 31.9% ($p < 0.05$) of rbST group. The mature blastocyst rate was higher in the group rbST (55.3%) than in the control group (7.1%; $p < 0.05$). The expanded blastocyst rate was 12.8% in the rbST group compared with the control group with 0% ($p < 0.05$). Progesterone concentrations were similar until day 3 sampling but on day 5 and 7 of the sample were statistically greater in rbST group ($p < 0.05$). Insulin concentrations were similar between groups until day 3 sampling but significant differences were shown on days 5 and 7 ($p < 0.05$). Concentrations of IGF-1 remained similar in both groups almost all sampling days except on day 3, when the rbST group presented a significantly different increment ($p < 0.05$). The results of this study suggest that the application of 500 mg of rbST at the time of artificial insemination in a superovulation program in *Bos indicus* cattle is effective in increasing embryonic development, the recovery rate and the percentage of transferable embryos and decreased the embryonic mortality. These effects are associated with significantly increased levels of progesterone, insulin and IGF-1.

Key words: Embryonic development, *Bos indicus*, superovulation, bovine growth hormone.

1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial y la superovulación/transferencia de embriones son tecnologías reproductivas que incrementan la capacidad de los individuos sobresalientes para dejar descendencia en la población, lo que permite un avance genético más acelerado. Aunque la eficiencia reproductiva promedio con estas tecnologías es satisfactoria, las variaciones individuales que se obtienen en los programas de superovulación y transferencia de embriones han obligado a buscar estrategias que permitan mejorar y hacer más homogéneos los resultados obtenidos (Sá Filho *et al.*, 2010).

El ganado cebú (*Bos indicus*) se ha adaptado fácilmente a climas tropicales y subtropicales, tolerando bien el calor y los parásitos. Además es resistente a la falta de agua en épocas de sequía. Sin embargo, los resultados de investigación y aplicación comercial de programas de superovulación y transferencia de embriones en ganado cebú en México y Brasil han sido inconsistentes en cuanto a la variación individual, ovocitos/embriones recolectados y calidad que varía entre cada donadora y en general distintos a los obtenidos con ganado *Bos taurus*. Por ello, al realizar programas de superovulación y transferencia de embriones deben tomarse en cuenta las diferencias fisiológicas reproductivas entre el ganado *B. indicus* y *B. taurus* como duración del estro (Mizuta, 2003), número de ondas de crecimiento folicular (Wolfenson *et al.*, 2004), número de folículos reclutados por onda de crecimiento folicular (Carvalho *et al.*, 2007), diámetro del folículo ovulatorio (Ginther *et al.*, 1989), diámetro del cuerpo lúteo (Ginther *et al.*, 1989) y de comportamiento reproductivo, como la corta duración del estro (Baruselli *et al.*, 2006).

Los programas de superovulación y transferencia de embriones permiten controlar farmacológicamente el desarrollo folicular y la ovulación, así como fijar el momento de la inseminación. Sin embargo, existen diversas variables que afectan los resultados en el ganado *Bos indicus*, incluyendo una débil manifestación del estro que dificulta su detección, peculiaridades fisiológicas, así como la gran variabilidad en la respuesta

folicular a la estimulación por gonadotropinas, siendo este último el mayor problema en los programas de transferencia de embriones (Barros y Noriega, 2001).

La variación que se ha encontrado en la respuesta a los esquemas utilizados para provocar superovulación en ganado *Bos indicus* hace necesario identificar los factores que influyen en los resultados, así como considerar la utilización de nuevas alternativas que permitan hacer más eficientes las técnicas de superovulación y transferencia de embriones. Debido a sus diferencias fisiológicas con respecto al ganado *Bos taurus*, no se debe asumir que las técnicas o variantes que se desarrollan en esta especie pueden ser directamente extrapoladas al ganado *Bos indicus*.

Una de las herramientas que se ha utilizado para mejorar la respuesta superovulatoria en ganado *Bos taurus* es la administración de hormona de crecimiento recombinante bovina (rbST). La hormona del crecimiento es una hormona de naturaleza proteínica producida en la adenohipófisis. Sus efectos fisiológicos son variados, ya que no solamente interviene en el crecimiento somático sino que está involucrada en el control del balance energético y la distribución de los nutrientes a los distintos tejidos. También modula diversos aspectos del desarrollo gonadal, la ingesta de alimentos, la conducta animal y partes de la fisiología de la reproducción, incluyendo el desarrollo folicular, gametogénesis, proliferación uterina y crecimiento celular. Además interviene en el desarrollo de la glándula mamaria que se produce alrededor del momento de la pubertad. La hormona del crecimiento tiene efectos metabólicos directos e indirectos. Actúa directamente para regular el metabolismo de lípidos y carbohidratos, mientras que sus efectos sobre el crecimiento de los músculos y cartílagos se logran mediante la estimulación de la secreción de IGF-I (factor de crecimiento tipo insulina I) por el hígado y otros tejidos (Bauman, 1992).

La hormona de crecimiento o somatotropina bovina de origen recombinante (rbST) se ha usado en ganado lechero para aumentar la producción láctea, aumentar el porcentaje de concepción y disminuir los días abiertos (Bauman, 1992; Morales-Roura *et al.*, 2001).

En algunos trabajos en los que se ha incluido el tratamiento con rbST en programas de superovulación y transferencia de embriones se ha logrado incrementar el reclutamiento folicular antes de la ovulación y estimular la síntesis de IGF-1 en muchos tejidos, incluido el ovario. Además en vacas no superovuladas se ha demostrado que el tratamiento con rbST provoca un incremento en las concentraciones de progesterona (Morales-Roura *et al.*, 2001) y estimula el desarrollo folicular (Gong *et al.*, 1991). Los efectos de la hormona del crecimiento sobre la foliculogénesis y otras funciones ováricas al parecer se deben a sus efectos directos asociados a los de otras hormonas, como gonadotropinas, IGF-1 e insulina, que estimulan la proliferación de las células de la granulosa, las células de la teca y las células lúteas, así como la producción de esteroides por dichas células.

Se ha reportado un incremento en el índice de concepción de vacas Holstein repetidoras tratadas con hormona del crecimiento al momento de la inseminación (29.3%) en comparación con las vacas repetidoras no tratadas (16.9%). Este efecto se asoció con un incremento en las concentraciones de progesterona circulante en el día 18 después de la inseminación (Morales-Roura *et al.*, 2001), por lo que se ha postulado que la elevación en las concentraciones de progesterona inducida por la rbST podría estimular el desarrollo embrionario y reducir la incidencia de mortalidad embrionaria. En ovinos superovulados, Mejía *et al.* (2012) encontraron que la administración de rbST al momento de la inseminación artificial provocó un aumento significativo en el número de ovulaciones y una elevación de las concentraciones de progesterona. Además, en las ovejas tratadas con rbST se colectaron embriones en estado de desarrollo más avanzado que en las no tratadas. Por otra parte, un estudio realizado en búfalos, en el que se inyectó 500 mg de rbST al inicio de la ablación folicular y reinyectado cada catorce días se registró un aumento en el desarrollo folicular, número de embriones recuperados (5.2 ± 0.5 vs 4.1 ± 0.5) e *in vitro* un incremento en el porcentaje de embriones de buena calidad (48.8 % vs 40.6%) (Sá Filho *et al.*, 2009).

En algunos reportes se ha mostrado un incremento en la respuesta superovulatoria de ambos ovarios y en el número de embriones recuperados (Niemann, 1991; Herrier *et al.*, 1994). En programas de fertilización *in vitro*, la administración de rbST a vacas productoras de leche donadoras de ovocitos, incrementó los porcentajes de fertilización, desarrollo embrionario y calidad embrionaria (Moreira *et al.*, 2002b). En un estudio subsecuente realizado en vacas Holstein donadoras, el tratamiento con rbST durante el día posterior al estro provocó un incremento en la proporción de embriones transferibles en las donadoras tratadas (77.2%) comparadas con las donadoras testigo (56.4%), así como un incremento en los porcentajes de gestación de receptoras tratadas con rbST que recibieron embriones provenientes de vacas del grupo testigo (43.2%) comparadas con receptoras del grupo testigo que recibieron embriones provenientes de vacas donadoras del grupo testigo (25.6%; Moreira *et al.*, 2002a).

Moreira *et al.* (2002a), reportaron un incremento en las tasa de gestación en vacas lecheras tratadas con rbST un día después del estro y reinyectando cada 14 días; así como en receptoras que recibieron embriones de vacas donadoras inyectadas con rbST al momento de la inseminación (Moreira *et al.*, 2001).

En algunos trabajos realizados en ganado cebú con rbST se han encontrado resultados positivos. Por ejemplo, en ganado cebú Nelore, cuando las vacas donadoras recibieron 250 mg de rbST antes de iniciar la sincronización estral para un programa de superovulación con FSH se obtuvieron más embriones viables en las vacas tratadas (8.1 ± 2.6) que en el grupo testigo (5.0 ± 1.6 ; Morales *et al.*, 2008). Sin embargo en dicho trabajo no se determinaron concentraciones hormonales. Buratini *et al.* (2000), encontraron un incremento del 36% en el número de folículos pequeños en novillas Nelore a las que se les administraron 320 mg de rbST en el segundo día postovulación comparadas con el grupo testigo que recibió solución salina, y dicho incremento estuvo asociado con un aumento significativo en las concentraciones de IGF-1. También se ha reportado una disminución en el porcentaje de ovocitos desnudos o degenerados (4.83%) en vacas Gyr tratadas con 160 mg de rbST y FSH

recuperados con aspiración folicular en comparación con aquellas tratadas solamente con rbST (14.37%) o sin ningún tratamiento (17.88%; Almeida *et al.*, 2007).

Sin embargo, no existen publicaciones de trabajos en los que se haya evaluado el efectos de la rbST al momento de la inseminación en vacas *Bos indicus* superovuladas, por lo que no se conocen los efectos de este tratamiento sobre la calidad y el grado de desarrollo embrionario ni sobre las concentraciones de progesterona, insulina e IGF-1 en este tipo de ganado.

2. HIPÓTESIS

La administración de la hormona de crecimiento bovina (rbST) al momento de la inseminación en vacas *Bos indicus* superovuladas incrementa los niveles de progesterona, insulina e IGF-I, así como la calidad y el grado de desarrollo de los embriones.

3. OBJETIVOS

Determinar el efecto de la administración de la rbST en el momento de la inseminación sobre la calidad y desarrollo de embriones recuperados de vacas donadoras *Bos indicus*.

Evaluar el efecto de la administración de la rbST en el momento de la inseminación sobre los niveles séricos de progesterona, IGF-I e insulina en vacas donadoras *Bos indicus*.

4.0 REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Superovulación en ganado *Bos indicus*

Las técnicas de mejoramiento genético permiten seleccionar como reproductores a individuos con características productivas sobresalientes, como mayor rendimiento en carne, producción lechera, capacidad de conversión alimenticia o precocidad. Una vez seleccionado un animal superior, la eficiente diseminación de sus genes por medio de biotecnologías reproductivas resulta en una mejora de la producción de toda una población animal y proporciona mejores ganancias económicas (Sá Filho *et al.*, 2010).

Sin embargo, el uso de estas tecnologías reproductivas no tiene el mismo resultado en los diferentes grupos genéticos. Existen diferencias en la fisiología y comportamiento reproductivo entre ganado *B. indicus* y *B. taurus*, que pueden afectar la eficiencia de los programas superovulatorios. Los programas de superovulación tienen algunas limitaciones, entre las que se encuentra la alta variabilidad en la producción de embriones por donadora, ya que cerca del 20 al 30% no responden al programa (Baruselli *et al.*, 2006).

Entre los problemas que se han detectado para el éxito de los programas de superovulación y transferencias de embriones en el ganado *Bos indicus* se encuentra su alta sensibilidad a la administración de gonadotropinas exógenas comparado con el ganado *Bos taurus*, la dificultad para detectar celos, la alta susceptibilidad al estrés y otras particularidades fisiológicas (Randel, 1984).

Al utilizar diferentes dosis de FSH (100, 133 y 200 mg) para la superovulación en ganado *B. indicus* no se encontraron diferencias significativas entre dosis en el número promedio de ovulaciones, en el total de estructuras recuperadas (ovocitos/ embriones), ni en el número de embriones transferibles (Baruselli *et al.*, 2003).

En diversos programas de superovulación utilizando diversas dosis de FSH en ganado *Bos indicus* se han encontrado bajas concentraciones de progesterona, por lo que se ha sugerido que lo que disminuye la eficiencia de dichos programas posiblemente sea

que el ganado *Bos indicus* presenta folículos preovulatorios y cuerpos lúteos de menor tamaño que los de ganado *Bos taurus*, lo que explicaría la menor secreción de progesterona y una menor intensidad en la manifestación del estro (Aguirre *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2007).

4.2 Somatotropina recombinante bovina (rbST)

4.2.1 Origen y estructura de la rbST

La somatotropina recombinante bovina (rbST) se obtiene clonando un segmento específico de DNA bovino en la bacteria *Escherichia coli* K-12. Esta bacteria transgénica produce una molécula biológicamente idéntica a la hormona de crecimiento bovina (Bauman, 1992).

4.2.2 Efecto de la somatotropina en el organismo

En el organismo la liberación de hormona de crecimiento (GH) desde la hipófisis anterior está regulada por hormonas producidas en el hipotálamo. La liberación de GH es estimulada por la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) e inhibida por la somatostatina (Squires, 2006a).

El receptor de la somatotropina (GHR) es una proteína transmembranal de 634-638 aminoácidos, con una masa molecular de alrededor de 70 KDa. El receptor libre se encuentra en forma monomérica en la membrana plasmática de la célula blanco. La unión de la hormona provoca la dimerización del receptor, ya que cada molécula de la somatotropina se une a dos moléculas de su receptor. El receptor de somatotropina es un miembro de una superfamilia de receptores de citocinas, la cual incluye más de 25 miembros, como los receptores de prolactina, leptina y eritropoyetina (Kopchick y Andry, 2000; Herrington y Carter-Su, 2001; Squires, 2006a). En el hígado, músculo, grasa y corazón se encuentran altos niveles de GHR (Schwartzbuer y Menon, 1998, Ballesteros *et al.*, 2000).

En el plasma está presente una proteína transportadora de hormona de crecimiento (GHBP), codificada por el mismo gen del receptor de somatotropina. La GHBP aumenta los efectos promotores del crecimiento de somatotropina, altera su distribución, farmacocinética y modula su acción (Baumann, 2001).

Hay dos tipos de efectos de somatotropina: directos e indirectos. Los efectos directos se deben a la unión de la somatotropina a sus receptores en las células diana, e incluye efectos sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales. (Eherton y Bauman, 1998; Squires, 2006a). En el metabolismo de los carbohidratos, la GH incrementa la tasa de gluconeogénesis en el hígado y disminuye la oxidación de la glucosa por el organismo (Bauman *et al.*, 1988; Sechen *et al.*, 1989). Cuando un animal se encuentra en balance energético positivo, la somatotropina reduce la tasa de lipogénesis, mientras que en los animales en balance energético negativo aumenta la lipólisis (Squires, 2006a).

Los efectos indirectos están relacionados con la proliferación celular, y son mediados principalmente por el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I), que es un potente factor mitogénico con cierto grado de homología con respecto a la insulina. La mayor parte del IGF-1 circulante se secreta en el hígado, pero diversos tejidos también lo secretan en respuesta a la presencia de GH. En animales en crecimiento el IGF-1 estimula la proliferación del cartílago en las bandas de crecimiento de los huesos largos, así como el desarrollo muscular. Las altas concentraciones de IGF-I circulante disminuyen la secreción de somatotropina por retroalimentación negativa directa sobre la hipófisis y también por estimulación de la producción de somatostatina en el hipotálamo (Squires, 2006b).

A través de sus efectos sobre la secreción de IGF-1, la administración de rbST en becerros aumenta significativamente la síntesis de proteína miofibrilar (18.8%), por lo que favorece el crecimiento muscular (Moreira *et al.*, 2010).

4.2.3 Efectos de la somatotropina bovina en la reproducción

El papel de GH en la reproducción es fundamental durante el proceso de concepción, fertilización y desarrollo embrionario. Existen diferencias entre sexos en los patrones de secreción de somatotropina, lo que explica las diferencias sexuales en los patrones de crecimiento durante la pubertad (Leung *et al.*, 2003; Squires, 2006b).

En la mujer uno de los factores que influencia la secreción de GH son los estrógenos. Durante el ciclo menstrual se da un aumento espontáneo en la secreción de GH e IGF-1 durante la fase periovulatoria en comparación con la fase folicular temprana, demostrando con esto el efecto de los estrógenos en el eje GH/IGF-1 (GH, IGF-I y GHBP; Ovesen *et al.*, 1998).

En el ovario del bovino, la administración de rbST incrementa el número y el diámetro en folículos de 2 a 5 mm. Este incremento guarda una relación positiva con las concentraciones plasmáticas de GH e IGF-I. Su aplicación previa a un programa de superovulación y en el momento del estro incrementa el número de folículos medianos y grandes (27.2 ± 3.6 vs 16.4 ± 3.1). Dichas hormonas alteran los patrones de foliculogénesis, actuando sobre las células de la granulosa e incrementando los porcentajes de ovulación (Advis *et al.*, 1981; Kirkwood *et al.* 1989; Gong *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1993; Lucy *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996).

En programas de recolección de ovocitos (OPU) y aspiración folicular, la administración de rbST incrementa el porcentaje (36%) y el número de folículos pequeños de 3 a 5 mm (9.13 ± 3.9 vs 6.45 ± 2.7), así como la tasa de recuperación de ovocitos de buena calidad (48.8% vs 40.5%; Sa Filho *et al.*, 2009, Buratini *et al.*, 2000).

En el útero, el gene que codifica para los receptores de hormona de crecimiento (GHR) se expresa en el endometrio, alcanzando su una máxima expresión en el día 5 del ciclo estral y disminuyendo sus niveles entre los días 12 al 19. (Sosa *et al.*, 2010). La presencia simultánea de estradiol, IGF-I y GH da lugar al crecimiento celular,

proliferación e incremento de la actividad secretora que prepara al útero para una posible gestación (Moreira *et al.*, 2002a).

In vitro la adición de hormona de crecimiento a medios de maduración promueve el desarrollo embrionario e incrementa la proporción y número de estructuras que se encuentran en estadio de blastocisto, lo que sugiere un mecanismo autocrino o paracrino de GH e IGF-1, que colaboran para estimular el desarrollo embrionario temprano, la mitogénesis, así como la secreción de factores de supervivencia, diferenciación y desarrollo fetal (Moreira *et al.*, 2002b).

La administración de rbST en vacas productoras de leche aumentó los porcentajes de gestación a los 63 y 73 días postparto (Moreira *et al.*, 2001). En vacas repetidoras con 3 a 4 servicios previos infértiles la administración de rbST al momento del estro, incrementó significativamente los porcentajes de concepción (Morales-Roura *et al.*, 2001). Bilby *et al.* (1999) encontraron que la administración de rbST en el momento de la inseminación, resulta en un incremento en las concentraciones de IGF-1 entre 6 y 14 días después de la inseminación, periodo que corresponde al periodo crítico en la expansión de las membranas embrionarias que precede al reconocimiento materno de la gestación.

En programas de transferencia de embriones (Fernandes *et al.*, 2009), el tratamiento de las vacas receptoras con rbST al momento del estro aumentó la tasa de gestación (65.7%) comparado con el grupo testigo (32.5%),

4.3 Efectos de rbST en la respuesta superovulatoria

4.3.1 Efectos de rbST sobre la tasa de ovulación

La administración de rbST en programas de inseminación artificial en bovinos, incrementó la respuesta ovulatoria, el número de cuerpos lúteos y el número de ovocitos fertilizados (Rieger *et al.*, 1991; Herrier *et al.*, 1994). Sin embargo, los resultados obtenidos varían de acuerdo a la raza, dosis y el momento de su aplicación en programas de superovulación.

El uso de rbST antes de iniciar un programa de superovulación aumentó significativamente el número de ovulaciones (18.9 ± 3.4 vs 11.4 ± 3.0) y disminuyó el número de animales que presentan una pobre respuesta ovulatoria (Gong *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 1996).

En ovinos los resultados han sido similares: En ovejas de la raza Pelibuey la aplicación de rbST al finalizar un programa superovulatorio incrementó la tasa de ovulación (86.52% vs 96.64%; Navarrete-Sierra *et al.*, 2008). De igual forma en ovejas de raza Suffolk la administración de 125 mg de rbST al momento del servicio aumenta el número de cuerpos lúteos, efecto que se ha atribuido a un posible aumento en las concentraciones de IGF-1, un estímulo de la esteroidogénesis folicular y el aceleramiento del proceso normal de crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa. (Crystal *et al.*, 1997; Mejia *et al.*, 2012).

En ganado bovino y ovino con suplementación energética y proteica la rbST incrementa la tasa de viabilidad embrionaria, lo que indica una acción sinérgica con el balance energético del animal (Songsasen *et al.*, 1999; Navarrete-Sierra *et al.*, 2008).

4.3.2 Efectos de rbST sobre el número y calidad embrionaria

La administración de rbST en programas de superovulación tiene un efecto positivo sobre la calidad de los embriones (Lucy *et al.*, 2004). La administración de rbST como parte de un programa superovulación incrementó el número de estructuras recuperadas y de embriones transferibles (Songsasen *et al.*, 1999; Herrier *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 1996; Moreira *et al.*, 2002b). En un trabajo realizado en ganado *Bos taurus* la administración de 500 mg de rbSt aumentó el porcentaje de embriones clasificados como transferibles (77.2% contra 56.4% en los testigo, Moreira *et al.*, 2002a). En otro trabajo la administración de 640 mg de rbST aumentó a 95.7% el total de embriones transferibles, comparado con el 77.7% de estructuras transferibles en aquellos animales que no recibieron ningún tratamiento (Herrier *et al.*, 1994).

4.3.3 Efecto de rbST sobre el desarrollo embrionario

La adición de rbST e IGF-1 a medios de maduración *in vitro* incrementa el estado de desarrollo de embriones bovinos, aumentando el número que se encuentran en etapa de blastocistos (Moreira *et al.*, 2002b). En ganado *Bos indicus*, la adición de rbST incrementó el porcentaje de producción de blastocistos *in vitro* (Almeida *et al.*, 2007).

In vivo, la aplicación de 500 mg rbST en ganado Holstein incrementó el número de embriones clasificados como blastocistos (2.4 ± 0.6 vs 0.4 ± 0.6 ; Moreira *et al.*, 2002a). De igual forma en ovinos raza Suffolk, la administración de 125 mg de rbST en el momento del servicio aumentó la proporción de embriones en estado de blastocistos expandidos (1.6 ± 0.4 vs 0.6 ± 0.4) comparado con blastocistos (0.7 ± 0.3) y blastocisto tempranos (0.3 ± 0.3 ; Mejia *et al.*, 2012).

4.4 Funciones de la progesterona en la reproducción

El cuerpo lúteo es una glándula endocrina temporal que sintetiza progesterona a partir del colesterol. La función principal de la progesterona es mantener la gestación. Además la progesterona tiene un papel relevante en la modulación de la dinámica folicular, la ovulación y la función uterina posterior a la ovulación (Aguirre *et al.*, 2006). La hormona luteinizante (LH) secretada por el lóbulo anterior de la hipófisis estimula la función del cuerpo lúteo en la mayoría de las especies, para lo cual la LH es secretada en bajos niveles durante la fase lútea del ciclo estral (Milvae *et al.*, 1996).

Los niveles de progesterona son afectados por diversos factores, entre los que se encuentra el balance energético del animal. Las vacas alimentadas con dietas altas en energía presentan concentraciones de progesterona más elevadas que aquellas con restricciones alimenticias (Harrison y Randel, 1986). En programas de superovulación se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de progesterona al realizar la recolección de embriones, el número de embriones transferibles y número de cuerpos lúteos. En general se considera que los niveles de

progesterona altos favorecen la fertilidad, calidad y desarrollo de los embriones (Ake *et al.*, 1999).

4.5 Efectos de IGF-I en la reproducción

El factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I), es una cadena polipeptídica simple de alrededor de 7,500 Da con una secuencia idéntica para humanos, porcinos y bovinos. Existen al menos 6 proteínas transportadoras para IGF-I, a las que se une y modulan las interacciones de IGF con sus tejidos diana. El IGF-I es sintetizado en el hígado junto con su principal proteína transportadora. El receptor tipo I para IGF-I es similar al receptor de la insulina (Lucy *et al.*, 1995; Squires, 2006b).

Cuando se secreta IGF-I por el estímulo de la hormona de crecimiento, promueve la proliferación de células de cartílago, la captación de aminoácidos, y la síntesis de proteínas. Diversos factores modulan la secreción de IGF-I (Houseknecht *et al.* 1988; Squires E.J., 2006). Uno de estos factores es la condición corporal, que guarda una relación positiva con IGF-I. Los animales con restricción alimenticia, con baja condición corporal o durante el puerperio presentan concentraciones séricas de IGF-I bajas, lo que disminuye la eficiencia productiva y reproductiva del animal. Cuando el estado endocrino de un animal es anabólico, el IGF-I se encuentra en niveles altos a pesar de que las concentraciones de hormona de crecimiento sean relativamente bajas (Houseknecht *et al.*, 1988; Galvis *et al.*, 2003; León *et al.*, 2004; Lucy, 2008).

Las concentraciones de IGF-I también son influidas por la etapa productiva; en vacas en lactación temprana las concentraciones de IGF-I disminuyen, comparado con la etapa final de la lactación o el periodo seco (Vicini *et al.*, 1991).

El IGF-I es el único componente del complejo de la superfamilia de IGF que tiene un papel esencial en la reproducción de los mamíferos. Durante el ciclo estral del bovino, la expresión endometrial de RNAm para IGF-I se eleva en la fase folicular y la fase lútea temprana (días 0 al 5; Sosa *et al.*, 2010). Existe evidencia de la presencia de

receptores para IGF-I en células de la granulosa, aumentando su número durante el desarrollo folicular, y disminuyendo durante la atresia (Spicer y Echtenkamp, 1995).

En estudios de cultivo *in vitro* de células de la granulosa se ha encontrado que los efectos de la FSH y LH son amplificados por el IGF-I y/o insulina, lo que favorece la actividad mitogénica y esteroidogénica de los folículos durante el estro (Sá Filho *et al.*, 2009).

En programas de superovulación se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de IGF-I y la actividad ovárica, así como un incremento en el número de ovulaciones, (Benyei *et al.*, 2011; Velázquez *et al.*, 2012). Además, en embriones en la fase de mórula las altas concentraciones de IGF-I favorecen la expresión de RNAm para sus propios receptores (IGF-1R), lo que favorece la proliferación de la masa celular interna durante la transición mórula-blastocisto. El IGF-I está implicado en la proliferación y diferenciación del embrión y el útero antes y durante la implantación (Moreira *et al.*, 2002a).

4.6. Funciones de insulina en la reproducción

La insulina es una hormona polipeptídica producida por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. Su papel principal es regular los niveles sanguíneos de glucosa, aumentando su captación por los tejidos y el almacenamiento como glucógeno o lípidos. Está formada por dos polipéptidos: una cadena A de 21 aminoácidos y una cadena B de 30 aminoácidos, ambas unidas por puentes disulfuro (Squires, 2006b).

Existe una correlación positiva entre las concentraciones periféricas de insulina y la condición corporal (León *et al.*, 2004). En varias especies, incluyendo los rumiantes, se ha demostrado que la insulina es necesaria para mantener la competencia reproductiva. Se ha observado que las concentraciones bajas de insulina pueden ocasionar ciclos estrales irregulares, bajos porcentajes de concepción y viabilidad reducida de las crías. La administración de insulina exógena a vacas en restricción

alimenticia incrementa su respuesta a la FSH, aumentando los porcentajes de ovulación, lo que confirma la influencia de insulina sobre la reproducción en el bovino (Hove, 1978; Harrison y Randel, 1986).

La insulina favorece el incremento en el peso de los cuerpos lúteos (Harrison y Randel, 1986) y la producción de progesterona (Spicer y Echterkamp, 1995). También estimula la proliferación de las células de la granulosa, favoreciendo la síntesis de esteroides (Langhout *et al.*, 1991; Spicer y Echterkamp, 1995).

4.7. Efectos de la rbST sobre los niveles séricos de insulina

La administración de rbST incrementa las concentraciones plasmáticas de insulina en animales en balance energético positivo, tales como vacas al final de la lactación, o durante el periodo de secado (Vicini *et al.*, 1991; Houseknecht *et al.*, 2000). El incremento de insulina en respuesta a la administración de rbST es probablemente el resultado de cambios metabólicos coordinados en el metabolismo de los carbohidratos, dirigidos específicamente al incremento en la disponibilidad de glucosa (cambios en producción y utilización de la glucosa). Como la rbST provoca un aumento en la disponibilidad de glucosa debido a un aumento en la síntesis como a una utilización periférica reducida, se produce un aumento en la secreción de insulina para regular los niveles de glucosa en sangre (Vicini *et al.*, 1991).

La adición de hormona de crecimiento a medios de cultivo *in vitro* de células de la granulosa con insulina, incrementa el número de células de la granulosa y la producción de progesterona comparándolo con cultivos que solamente tienen insulina, lo que sugiere que la hormona de crecimiento tiene un efecto en sinergia con insulina sobre la función folicular en el ovario *in vivo* (Langhout *et al.*, 1991).

4.8. Efecto de rbST sobre los niveles séricos de IGF-I

Se ha demostrado que la administración en diferentes momentos de diversas dosis de rbST estimula la producción de IGF-1 tanto en vacas como en becerros de ganado

Bos indicus y *Bos taurus* (Buratini *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2010; Velázquez *et al.*, 2011).

En un estudio la aplicación de 250 mg de bST incrementó los niveles plasmáticos de IGF-I de 143 ng/ mL⁻¹ en los animales testigo a 248 ng/ mL⁻¹ en animales tratados. La aplicación de una dosis de 500 mg en el momento de la inseminación también incrementó significativamente las concentraciones séricas de IGF-1 e insulina, lo que se asoció con un efecto favorable sobre la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Rodríguez *et al.*, 2009).

El uso de rbST al iniciar un programa de sincronización en bovinos, incrementa las concentraciones de IGF-I intrafoliculares y plasmáticas a partir del segundo día después de iniciado el tratamiento (Gong *et al.*, 1991; Velazquez *et al.*, 2011).

En un estudio de superovulación se encontró que la aplicación de rbST duplicó el contenido de IGF-I en folículos de diferentes tamaños (<4mm, 4 a 8 mm y > a 8mm), encontrándose una correlación significativa entre los niveles de IGF-I en el fluido folicular y el plasma. Estos aumentos de IGF-1 se asociaron con un incremento en el número de folículos y cuerpos lúteos (12.5±3.2 vs 4.3±2.0), por lo que se sugirió que el IGF-I amplificó la respuesta a la acción de FSH (Herrier *et al.*, 1994).

El pretratamiento con rbST antes de iniciar un programa de superovulación con PMSG incrementó significativamente las concentraciones de IGF-I 48 h después de su aplicación, manteniéndose elevados alrededor de 8 días (Gong *et al.*, 1993).

Todo esto lleva a encontrar una correlación positiva entre las concentraciones circulantes de IGF-I y el número de embriones viables recuperados de vacas superovuladas (Gong *et al.*, 1993). Por el contrario, los bajos niveles de IGF-I circulante durante un programa de superovulación se han relacionado con un desarrollo embrionario reducido (LeRoy *et al.*, 2008).

4.9. Efecto de rbST sobre los niveles séricos de progesterona

En bovinos, la administración de rbST previo a un programa de superovulación o en el momento del estro aumenta las concentraciones plasmáticas de progesterona (Lucy *et al.*, 1995). En forma similar, en ovejas de raza Suffolk, la rbST aplicada en el momento del servicio incrementó las concentraciones de progesterona a partir del 6 día posterior a la aplicación (Mejia *et al.*, 2012). En bovinos al administrar rbST el día del estro se encontró un incremento significativamente el peso de los cuerpos lúteos (9.3 ± 0.5 vs 5.8 ± 0.4 gr), este aumento de peso estuvo relacionado con el incremento en los niveles de progesterona (Lucy *et al.*, 1995). También se ha observado una relación positiva entre los niveles de progesterona y el número de embriones totales colectados y el desarrollo embrionario, debido a que rbST aumenta la respuesta superovulatoria (Rieger *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1993). Resultados similares se han reportado al realizar cultivos de células de la granulosa, en los que rbST e insulina, tienen un efecto positivo sobre el número de células y producción de progesterona (Langhout *et al.*, 1991).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

El trabajo experimental se realizó en la empresa pecuaria privada “Rancho Atehuetzin” localizado en el Municipio de Hueytamalco, Puebla, México. El rancho se localiza a 19°56´ latitud norte y 97°17´ longitud oeste, a una altitud de 700 msnm, presenta un clima templado húmedo con lluvias todo el año (cf) (INEGI, 2008). El trabajo se realizó en los meses de marzo y abril.

5.2 Animales y grupos experimentales

Como donadoras se utilizaron 12 vacas cebú de 6.4 ± 1.1 años de edad, con un peso vivo de 539 ± 20 kilogramos, clínicamente sanas, no gestantes y no lactantes, con 185 ± 36.4 días posparto. Antes de iniciar el estudio se determinó por medio de detección de estros y palpaciones rectales seriadas que todas las vacas presentaran ciclos estrales regulares. Las vacas fueron aleatoriamente asignadas al grupo experimental (grupo rbST) o al grupo testigo.

5.3 Alimentación

Dos meses antes del inicio del trabajo todas las vacas fueron vitaminadas (complejo B) y desparasitadas. Durante todo el periodo experimental los animales pastorearon en praderas de zacate Estrella de África (*Cynodon plectostachyus*) y pastos nativos, recibieron entre 3 a 4 kilos de un suplemento comercial con 14% de proteína cruda y 2.5 Mcal de energía metabolizable por kilogramo, además de agua y sales minerales a libre acceso.

5.4 Trabajo Experimental

Para propósitos de este trabajo el día de la aplicación de los 500 mg de rbST durante la inseminación en el programa superovulatorio se consideró como el día 0. En el cuadro 1 se resume el protocolo experimental. Antes de iniciar el programa de superovulación las vacas fueron presincronizadas. Para ello se aplicaron 2 dosis de 25

mg de Prostal[®] (Cloprostenol, Laboratorio Brovel) los días -41 y -27 del programa de superovulación. El día -13 se aplicó 25 mg de Prostal[®] para lisar los cuerpos lúteos presentes, y se insertó un dispositivo intravaginal de liberación prolongada CIDR[®] (Laboratorio Pfizer). En el día -7 se les aplicó por vía intramuscular (IM) 300 µg de GnRH (Ovalyse[®] Laboratorio Pfizer). Para el programa de superovulación se aplicaron entre el día -6 y el día -2 un total de 8 dosis decrecientes de hormona folículo estimulante (FSH; Folltropin-V[®] 400 mg de NIH-FSH-P1 en 20 mg/ mL⁻¹, laboratorio Tornel) aplicadas por vía intramuscular a intervalo de 12 horas. El día -3 además de la dosis de FSH se aplicaron 25 mg de Prostal[®] por vía intramuscular. El día -2 se retiró el CIDR[®] y se aplicó nuevamente 25 mg de Prostal[®] vía IM. El día -1 se aplicaron por vía intramuscular 300 µg de Ovalyse[®] (Bó *et al.*, 2010).

A partir del día -1 se realizó la detección de celos por observación visual durante dos periodos de 2 horas cada uno (18:00 a 20:00 y 6:00 a 8:00). Se consideró que una vaca estaba en celo cuando se quedaba completamente quieta y se dejaba montar por otra vaca. Se registró el número de vaca, fecha y hora del celo. Al iniciarse el celo 7 vacas donadoras fueron asignadas aleatoriamente al grupo rbST y 5 vacas se asignaron al grupo testigo. Las vacas de ambos grupos fueron inseminadas 12 y 24 horas después del inicio del celo. Durante la primera inseminación al grupo rbST se le administró una inyección de 500 mg de somatotropina bovina recombinante (rbST, Boostin-S[®], Internet Schering-Plough Animal Health) por vía subcutánea en el pliegue anocaudal, véase cuadro 1. El semen utilizado para la inseminación fue de toros de raza Sardo negro, envasado en pajillas de 0.5 ml. Las pajillas con semen se descongelaron en agua tibia a 37°C durante 30 segundos. Se evaluó la viabilidad y motilidad espermática mediante evaluación microscópica de alguna de las pajillas.

Siete días posteriores a la inseminación por medio de palpación rectal se determinó el número de cuerpos lúteos y se realizó la recuperación de los embriones por la técnica no quirúrgica (IETS, 1987). Posteriormente en el laboratorio, el líquido del filtro fue pasado a una caja de petrí, realizando 3 lavados de enjuague al filtro, procediendo a la observación y clasificación de las estructuras obtenidas, ya sea óvulos o embriones.

Cuadro 1

Programa de superovulación y colección de embriones

Día	AM 7:00	PM 7:00
-41	25 mg de Prostal [®]	
-27	25 mg de Prostal [®]	
-13	25 mg de Prostal [®] + CIDR	
-7	300 µg de Ovalyse [®]	
-6		2.0 ml Folltropin-V [®]
-5	2.5 ml Folltropin-V [®]	1.5 ml Folltropin-V [®]
-4	1.5 ml Folltropin-V [®]	1.5 ml Folltropin-V [®]
-3	1.0 ml Folltropin-V [®]	1.0 ml Folltropin-V [®] + 25 mg Prostal [®]
-2	1.0 ml Folltropin-V [®]	Retiro de CIDR [®] + 25 mg Prostal [®]
-1	300 µg de Ovalyse [®]	Detección de estro
0	Inseminación artificial Solo en grupo rbST: 500 mg de Boostin-S [®]	Inseminación artificial
7	Colección de embriones	

Los embriones obtenidos se observaron al microscopio estereoscópico clasificándolos de acuerdo a la etapa embrionaria en: 1.- embrión de una célula, 2.- embrión de 2-16 células, 3.- mórula temprana, 4.- mórula, 5.- blastocisto temprano, 6.- blastocisto, 7.- blastocisto expandido, 8.- blastocisto eclosionado. La clasificación con base en la calidad fue: 1.- excelente, 2.- bueno, 3.- regular, 4.- malo (Lindner y Wright, 1983; IETS 1987; Górlach, 1997).

5.5 Muestreo sanguíneo y procesamiento de muestras

Se recolectaron muestras sanguíneas cada tercer día por punción de la vena coccígea utilizando tubos al vacío sin anticoagulante, considerando como el día 0 el día en que se aplicaron 1500 mg de rbST al grupo tratado (grupo rbST) durante la inseminación, el muestreo inicio el día -6 y continuo hasta el día 7 del programa superovulatorio. Las muestras sanguíneas se mantuvieron a 4°C hasta su centrifugación (2500 rpm/15 min) para obtener el suero, el cual fue almacenado a -20°C hasta realizar los análisis para las determinaciones hormonales en el laboratorio de endocrinología de Departamento Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

Las concentraciones de progesterona se determinaron mediante radioinmunoanálisis en fase sólida, empleando el kit Coat-A-Count® Progesterona (Siemens Medical Solution, Los Angeles, Ca., U.S.A), con sensibilidad de 0.2 ng/ml, coeficiente de variación intra ensayo de 4.0 % y un coeficiente de variación inter ensayo de 5.7 %.

Las concentraciones de IGF-1 se determinaron mediante enzimo inmunoensayo (ELISA) en placas de microaglutinación empleando el kit ALPCO Immunoassays, 22-IGFHU-E01 (ALPCO Diagnostics, 26G Keewaydin Drive-Salem NH 03079), con sensibilidad de 0.09 ng/ mL⁻¹, coeficiente de variación intraensayo de 5.69 % y un coeficiente de variación inter ensayo de 6.11 %.

Las concentraciones séricas de insulina se determinaron empleando el kit ELISA Insuline (bovine) 80-INSBO-E01 (ALPCO Diagnostics, 26G Keewaydin Drive-Salem NH 03079), con una sensibilidad de 0.100 ng/ mL⁻¹, coeficiente de variación intra ensayo de 3.5 % y un coeficiente de variación inter ensayo de 7.72%.

5.6 Análisis estadístico

Las concentraciones de progesterona, IGF-1 e insulina de las donadoras se compararon mediante un análisis de varianza para mediciones repetidas, considerando el grupo y el día del ciclo como variables independientes.

Se utilizó la prueba de Ji-cuadrada para tablas de contingencia para comparar el número de embriones recolectados por grupo, así como su distribución en las distintas categorías de grado de desarrollo.

6. RESULTADOS

En este trabajo no se recuperaron ovocitos sin fertilizar en ninguno de los dos grupos. En el cuadro 6.1 se muestra el porcentaje de recuperación embrionaria y el porcentaje de embriones transferibles obtenidos en el grupo rbST y en el grupo testigo. Se observó una diferencia ($p < 0.01$) en el porcentaje de recuperación (embriones recuperados/ cuerpos lúteos) entre las vacas del grupo rbST y el grupo testigo. El porcentaje de embriones transferibles (embriones transferibles /total de embriones) fue mayor en el grupo rbST que en el testigo ($p < 0.01$).

Cuadro 6.1

Porcentaje de recuperación y porcentaje de embriones transferibles obtenido en el grupo rbST y el grupo testigo.

	Grupos	
	Tratado rbST	Testigo
	n=7	n=5
Porcentaje de recuperación (embriones recuperados /cuerpos lúteos)	70.1% ^a (47/67)	25.9 % ^b (14/54)
Porcentaje de embriones transferibles (embriones transferibles /total embriones)	68.9% ^a (32/47)	14.3% ^b (2/14)

a,b: Valores son distinta literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La distribución de los embriones obtenidos se muestra en el cuadro 6.2, clasificándolos de acuerdo a su grado de desarrollo en embriones degenerados, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido obtenidos al realizar los lavados el séptimo día posterior a la inseminación. El porcentaje de embriones degenerados fue mayor en el grupo testigo con respecto al grupo rbST ($p < 0.05$). El porcentaje de blastocistos tempranos fue mayor en el grupo testigo comparado con el grupo rbST ($p < 0.05$). El porcentaje de blastocistos fue mayor en el grupo rbST comparado con el grupo testigo ($p < 0.05$). El porcentaje de blastocistos expandidos fue mayor en el grupo tratado comparado con el grupo testigo ($p < 0.05$).

Cuadro 6.2.

Distribución de acuerdo al grado de desarrollo de los embriones obtenidos en los lavados el día siete posterior a la inseminación.

Grupo	Embriones degenerados	Blastocisto temprano	Blastocisto	Blastocisto expandido
Tratado rbST n=7	0% ^a 0	31.9% ^a 15	55.3% ^a 26	12.8% ^a 6
Testigo n=5	50% ^b 7	42.8% ^b 6	7.1% ^b 1	0% ^b 0

a,b: Valores son distinta literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Las concentraciones promedio de progesterona en diferentes días de muestreo se muestran en la figura 6.3. Las concentraciones de la hormona fueron similares hasta el día 3 posterior a la IA y aplicación de rbST, no obstante en los días de muestreo 5 y 7 fueron diferentes ($p < 0.05$). Las concentraciones promedio de progesterona en las vacas del grupo rbST alcanzaron un máximo de 83.1 ng/ mL^{-1} el día 7, mientras que en las vacas del grupo testigo el máximo nivel fue de 26.1 ng/ mL^{-1} , el cual fue alcanzado el día 5 del muestreo.

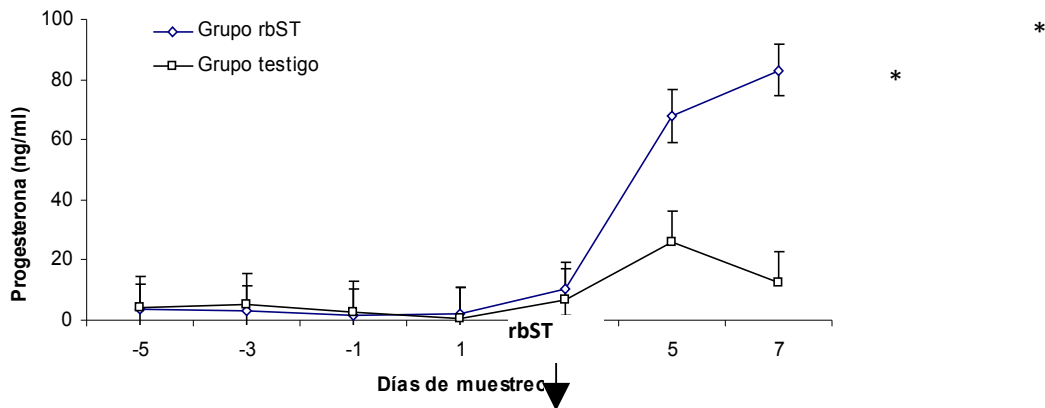


Figura 6.3. Concentraciones séricas de progesterona (media \pm error estándar) los días -5 al 7 del muestreo en vacas tratadas con 500 mg de rbST aplicado en el momento del servicio en el grupo de rbST ($n=7$) y el grupo testigo ($n=5$). Las barras representan el error estándar, la flecha indica el día de la administración de rbST. Los asteriscos (*) indican el día de muestreo en el que las concentraciones de progesterona fueron diferentes entre los grupos ($p < 0.05$).

En las vacas del grupo rbST las concentraciones de insulina se elevaron a partir del día 3, manteniéndose por encima de los 0.70 ng/ mL^{-1} hasta el día 7 del muestreo, que alcanzaron 1.13 ng/mL^{-1} . En las vacas del grupo testigo las concentraciones de insulina permanecieron constantes del día -5 al 7 con respecto a la IA, para el día 7 las concentraciones de insulina fueron de 0.47 ng/ mL^{-1} .

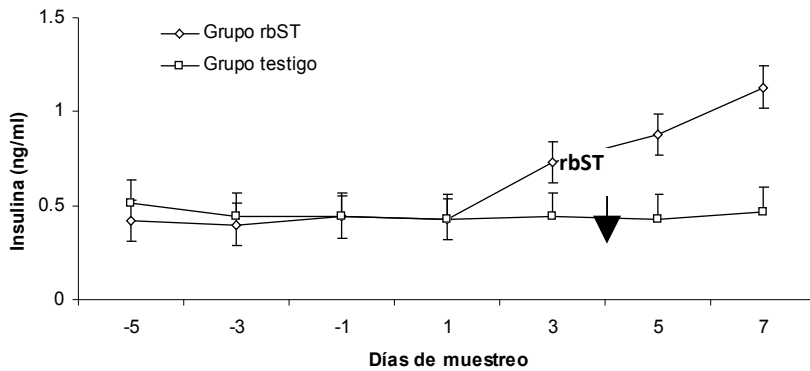
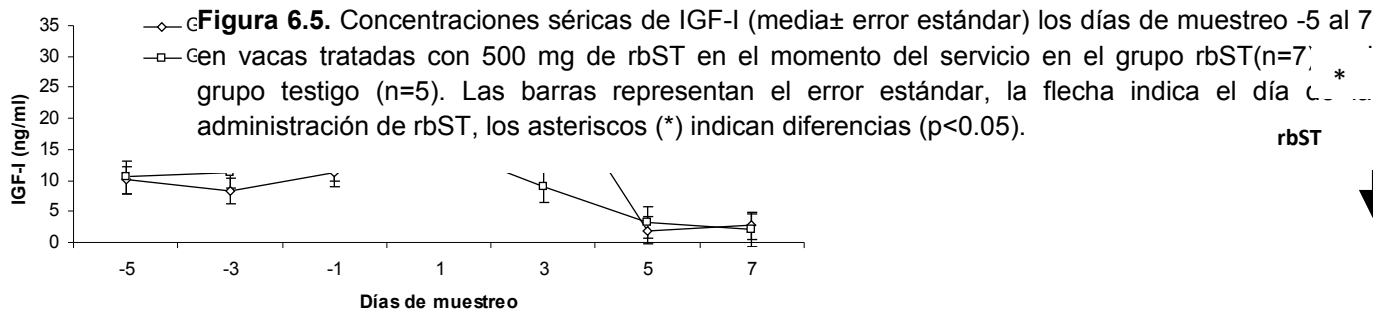


Figura 6.4. Concentraciones séricas de insulina (media± error estándar) en los días -5 al 7 del muestreo en vacas tratadas con 500 mg de rbST aplicado en el momento del servicio en el grupo rbST(n=7) y el grupo testigo (n=5). La flecha indica el día de la administración de rbST, las barras representan el error estándar. Los asteriscos (*) indican el día de muestreo en la que las concentraciones de insulina fueron diferentes ($p < 0.05$).

En la figura 6.5 se muestran las concentraciones promedio de IGF-I en diferentes días de muestreo. Las concentraciones de la hormona permanecieron similares en ambos grupos durante casi todos los días de muestreo, solo existieron diferencias entre grupos el día 3 posterior a la IA y aplicación de rbST ($p < 0.05$), en el que el grupo rbST alcanzó concentraciones de $27.88 \text{ ng/ mL}^{-1}$. Las concentraciones promedio de IGF-I en ambos grupos descendieron gradualmente del día 5 al 7, llegando ambos grupos a presentar valores promedio menores a 1.97 ng/ mL^{-1} en el último día del muestreo.



7. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo confirman la hipótesis de que la administración de 500 mg de rbST al momento de la inseminación en un programa de superovulación en ganado *Bos indicus* incrementa la supervivencia embrionaria y/o el desarrollo embrionario (p<0.05) así como el porcentaje de embriones transferibles (p<0.01), y las concentraciones séricas de progesterona, insulina e IGF-1, aunque en esta última sólo sea de manera aguda (p<0.05).

La elevación en las concentraciones séricas de progesterona no estuvo asociada a un aumento en el número de ovulaciones en el grupo tratado con rbST, ya que en las 7

vacas del grupo tratado se encontraron 67 CI (9.6 por animal), mientras que en el grupo testigo se encontraron 54 CI (10.8 por animal), lo que contrasta con los resultados de Gong et al. (1996) quienes si encontraron que la administración de rbST resultó en un aumento en el número de cuerpos lúteos en vacas superovuladas y el número de ovulaciones (18.9 ± 3.4 vs 11.4 ± 3.0). Mejía et al. (2012) quienes trabajaron con ovejas superovuladas, también encontraron que el número de ovulaciones fue mayor en el grupo tratado con rbST al momento de la inseminación que en el grupo testigo (16.8 ± 1.8 vs 9.3 ± 1.8).

El aumento en las concentraciones de progesterona encontrado en el presente trabajo en el grupo rbST a pesar de que las vacas de dicho grupo no tenían más cuerpos lúteos que las testigo puede deberse a que el cuerpo lúteo bovino, específicamente las células lúteas grandes, expresan un mayor número de receptores para somatotropina que cualquier otra estructura en el tracto reproductivo bovino, por lo que la rbST tiene una acción directa (Lucy *et al.*, 1995). La administración de rbST pudo actuar directamente en las células foliculares durante su luteinización, y posteriormente en las células lúteas, generando cuerpos lúteos de mayor calidad. Además indirectamente rbST pudo actuar a través del aumento que provocó en las concentraciones de insulina y transitoriamente en IGF-1, estimulando la proliferación y diferenciación de las células endoteliales (Schams & Berisha, 2004), y la producción de factores de crecimiento endotelio vascular en las células luteínicas dando como resultado el incremento en las concentraciones de progesterona (Schams *et al.*, 2001; Navarrete-Sierra *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 2012).

El porcentaje de recuperación embrionaria en este estudio (embriones recuperados/cuerpos lúteos) fue muy superior en el grupo rbST (70.1%) comparado con el grupo testigo con 25.9% ($p < 0.01$; Cuadro 6.1), por lo que rbST tuvo un efecto positivo. Sin embargo, este tipo de resultados no han sido consistentes, ya que Gong *et al.* (1996) solo encontraron un incremento moderado en el porcentaje de recuperación (50% en el grupo testigo vs 62 % en el tratado con rbST). Por otra parte, el porcentaje de recuperación del grupo rbST en el presente estudio (70.1%) se

encuentra dentro de los rangos reportados (59% a 82 %) por Gradela *et al.* (1995) en un programa de superovulación en ganado *Bos indicus* sin administrar rbST. Por el contrario en un estudio realizado en ovejas (Mejia *et al.*, 2012) en el que se aplicó rbST al momento del servicio en un programa de superovulación el porcentaje de recuperación fue menor en el grupo tratado con rbST (39.3%) que en el testigo (94.3%).

La razón del reducido porcentaje de recuperación en el grupo testigo no fue asociado con la habilidad del técnico, pues el procedimiento en ambos grupos fue realizado por la misma persona. Una posibilidad pudo ser que la presencia de embriones degenerados en el grupo testigo el día de la recuperación embrionaria, pudo interferir con la eficiencia de recuperación. El contraste en los resultados de los trabajos descritos en los párrafos anteriores puede estar asociados en parte con el hecho de que en otros estudios ha variado el momento de la aplicación de rbST respecto al programa de superovulación, así como la dosis (Kuehner *et al.*, 1993). Lo que sugiere que el momento de la aplicación de rbST en relación al tratamiento con gonadotropinas es importante para el resultado obtenido (Gong *et al.*, 1993).

El porcentaje de embriones transferibles, fue muy superior ($p < 0.01$) en el grupo tratado comparado con el grupo testigo (Cuadro 6.1). Estos resultados coinciden con diversos trabajos, entre ellos el de Navarrete-Sierra *et al.* (2008) en borregas, que al administrar rbST durante las ocho aplicaciones de FSH en el programa de superovulación, observaron un incremento en la tasa de viabilidad embrionaria (54.69 vs 82.05%), así como con el de Herrier *et al.* (1994) que al administrar rbST el día 4 previo al programa de superovulación observaron un incremento en el porcentaje de embriones transferibles (4.2 ± 1.0 vs 2.5 ± 0.7). Por el contrario Kuehner *et al.* (1993) administraron a un grupo de vacas 500 mg de rbST, 7 días antes del inicio del tratamiento superovulatorio, y a un segundo grupo les administraron rbST en el momento de la inseminación del estro superovulatorio. En ninguno de estos grupos se observó diferencia significativa en el porcentaje de embriones transferibles con respecto al grupo testigo (rbST previo a la superovulación: 7.1 ± 1.4 ; rbST al momento

de la inseminación: 7.0 ± 1.7 ; grupo testigo: 5.9 ± 1.4). Por el contrario Gong *et al.* (1993) al hacer un pretratamiento con rbST al programa de superovulación, encontraron una mejora en el porcentaje de embriones transferibles ($90.0 \pm 11.2\%$ / testigo vs $48.2 \pm 7.8\%$ / tratado).

Una posible explicación de la variabilidad en la respuesta a rbST puede ser que los efectos de la rbST sobre el desarrollo embrionario dependan del momento de su aplicación. Por ejemplo, rbST altera el ambiente oviductual, aumentando sus secreciones, como ocurre en conejos gestantes (Herrler *et al.*, 1992). La aplicación de rbST durante el estro superovulatorio, favorece la etapa de fertilización y el desarrollo embrionario durante los primeros 7 días, aumentando el porcentaje de ovocitos fertilizados y la proporción de embriones transferibles (Moreira *et al.*, 2002a; Morales, 2000). Se ha observado que rbST modifica el ambiente uterino, lo cual favorece las condiciones del desarrollo embrionario, ya que existen receptores para GH e IGF-1 en el endometrio (Lucy *et al.*, 1998; Pershing *et al.*, 2002) y se ha localizado mRNA para receptores a IGF-1 en las glándulas endometriales (Pershing *et al.*, 2002; Stevenson *et al.*, 1994). Por otro lado el aumento en las concentraciones séricas de insulina, favorece el desarrollo embrionario temprano, además ejerce una acción mitogénica y antiapoptóticas (Boland *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2002; Augustin *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se encontró que la administración de rbST disminuye la mortalidad embrionaria y favorece el desarrollo de los embriones en vacas cebú superovuladas. El 50% de los embriones recuperados en el grupo testigo fueron embriones degenerados y el 42.8% embriones en etapa de blastocisto temprano. Así mismo en este grupo se recuperó una menor proporción de embriones en etapa de blastocisto (7.1%) y no se recuperaron blastocistos expandidos. En cambio, en el grupo rbST el 55.3 % de los embriones se encontraban en la etapa de blastocistos, el 14.3% en estadio de blastocisto expandido, sin encontrarse embriones muertos.

Es importante señalar que en los programas de superovulación en ganado bovino, menos del 50% de los embriones recolectados son viables para el día 7 posterior a la

inseminación. La etología de la muerte embrionaria es de naturaleza diversa, pero puede resumirse en factores genéticos y ambientales. Las anomalías cromosómicas son responsables de menos de 10% de las muertes embrionarias, mientras que los factores ambientales contribuyen el 90% (Sreenan *et al.*, 2001). Aunado a esto Hyttel *et al.* (1991) indicaron que los tratamientos superovulatorios afectan negativamente a el ovocito o a la maduración de las células de la granulosa comprometiendo no solo la fertilización sino la viabilidad embrionaria.

Se sabe que los embriones no competentes no culminan las divisiones celulares tempranas exitosamente y se bloquea su desarrollo antes de alcanzar el estadio de blastocisto, mientras que los competentes regulan la presentación de apoptosis y alcanzan los estadios preimplantatorios (Tarazona *et al.*, 2010). Se plantea que el bloqueo de los embriones es consecuencia de la incapacidad para activar genes importantes para el desarrollo y para soportar el estrés producido por el ambiente alterado al cual están sometidos (temperatura, humedad, pH, gases; Greenwood y Gautier, 2005). Esto puede explicar que en el presente estudio, los embriones degenerados recolectados en el grupo testigo el día 7, se encontraban en las primeras etapas de división celular (2-4 blastómeros). Lo que indica que la muerte ocurrió en los primeros 2 a 3 días de la gestación.

Por otro lado una posible explicación enfocada al balance nutricional de los animales y a el alto porcentaje de mortalidad en el grupo testigo, puede relacionarse con lo reportado por Lenoy *et al.* (2008) en el que vacas en balance energético negativo generalmente tienen concentraciones elevadas en sangre de ácidos grasos no esterificables (NEFA), urea, β -hidroxibutirato, y bajas concentraciones circulantes de glucosa e IGF-1. Ambientes con altas concentraciones de NEFA y bajos en glucosa durante la maduración del ovocito disminuye el desarrollo, competencia y perjudica el desarrollo embrionario temprano. Se ha visto que folículos que crecen durante el periodo de balance energético negativo pueden afectarse y generar ovocitos con menos potencial para desarrollar embriones viables (Boland *et al.*, 2001; Leroy *et al.*, 2005)

Al parecer la administración de rbST en el grupo tratado, favoreció la sobrevivencia embrionaria. El tratamiento con rbST puede evitar el efecto de algunos factores tóxicos para los embriones presentes en el ambiente uterino. Así el IGF-I bloquea la inducción de apoptosis causada por el estrés calórico y mitiga el efecto del etanol en el desarrollo embrionario, por lo que la rbST actuaría como un factor de sobrevivencia ante agentes uterinos embriotoxicos (Jousan y Hausen, 2004). Bildy *et al.*, 1999 encontró que la administración de rbST en el momento de la inseminación incrementa las concentraciones de IGF-1, y aunque en el presente estudio fue de manera aguda 3 días posteriores a su aplicación, este aumento ocurrió en un periodo crítico de la división y diferenciación embrionaria. La aplicación de rbST durante el estro superovulatorio, favorece la etapa de fertilización y el desarrollo embrionario durante los primeros 7 días, aumentando el porcentaje de embriones vivos (Moreira *et al.*, 2002a; Morales, 2000).

El desarrollo embrionario encontrado en el presente trabajo coinciden con lo encontrado por Mejia *et al.* (2012) en ovejas superovuladas, en el que la administración de rbST al momento del servicio resultó en la recuperación de embriones en estado significativamente más avanzado de desarrollo en el grupo rbST que en el grupo testigo.

Los efectos de la rbST sobre el desarrollo embrionario pueden ser directos o indirectos, mediados en este último caso por las modificaciones en las concentraciones de otras hormonas como resultado de su administración. Como se mencionó anteriormente IGF-1 se incrementó de manera transitoria 3 días posteriores a la inseminación (Geisert *et al.*, 1991), favoreciendo el desarrollo embrionario. Moreira *et al.* (2002b) informaron que cuando a los medios de maduración *in vitro* de ovocitos se les adiciona GH e IGF-I se favorece el desarrollo embrionario. Sin embargo, si se agregan anticuerpos contra IGF-1 al medio de cultivo, el desarrollo embrionario temprano no se ve afectado. Esto confirma que GH tiene también efectos directos sobre el embrión, aunque también podría actuar sobre los receptores para GH presentes en células del *cumulus* y del ovocito (Izadyar *et al.*, 1997).

Una de las hormonas que pudo haber mediado los efectos estimulantes de la rbST sobre el desarrollo embrionario es la progesterona, ya que en las muestras obtenidas en el día 5 y 7 post-inseminación y aplicación de rbST, las concentraciones de progesterona fueron significativamente más elevadas en el grupo rbST que las encontradas en el grupo testigo (figura 6.3). Mejia *et al.* (2012) reportaron resultados similares en ovejas tratadas con rbST en el momento del servicio, en el que las concentraciones de progesterona en el grupo tratado se incrementan significativamente 6 días posteriores a la inseminación, sugiriendo que el efecto estimulador de rbST sobre el desarrollo embrionario obtenido, pudo haber estado también mediado por progesterona. En ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* tratados con rbST en diferentes etapas del programa superovulatorio o con aplicación cada 14 días, presentan un incremento significativo en los niveles de progesterona. Las concentraciones máximas de progesterona encontradas en el grupo testigo en el presente trabajo ($26.1 \pm 10.28 \text{ ng/ mL}^{-1}$) se encuentran en los rangos reportados en programas de superovulación en ganado *Bos indicus* ($29.90 \pm 3.67 \text{ ng/ mL}^{-1}$; Grabela *et al.*, 1995). En cambio, las concentraciones máximas encontradas en el grupo rbST (83.1 ng/ mL^{-1}) son mucho más elevadas que las reportadas por otros autores, por lo que pudieron haber estimulado el desarrollo embrionario.

Otros autores han encontrado una correlación positiva entre niveles elevados de progesterona y el incremento en el porcentaje de estructuras recuperadas y embriones transferibles (Ake *et al.*, 1999; Benyei *et al.*, 2011). Además, diversos estudios indican que las concentraciones elevadas de progesterona en los primeros días después del servicio favorecen la fertilidad de las vacas, la calidad embrionaria y el desarrollo embrionario, lo que coincide con lo encontrado en este trabajo (Erb *et al.*, 1976; Jensen *et al.*, 1982; Mann *et al.*, 1996).

Los niveles de insulina encontrados en el presente trabajo, fueron diferentes entre grupos ($p < 0.05$) a partir del día 5 del muestreo, previo a la recolección de los embriones. Sin embargo el uso de rbST ha producido resultados variables con respecto a las concentraciones de insulina circulantes, aumentando (Chase *et al.*,

2011), disminuyendo (Azza *et al.*, 2010) o dejando sin cambio las concentraciones de insulina (Neathery *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con un estudio realizado en vacas en periodo de secado y en la etapa final de la lactación (con balance energético positivo), donde se administró rbST por 7 días, reportando un incremento en los niveles de insulina, presumiblemente debido al incremento en la gluconeogénesis y disminución de la oxidación de la glucosa (Vicini *et al.*, 1991). La adición de GH e insulina a medios de maduración *in vitro* conteniendo células de la granulosa tuvo un efecto positivo sobre el número de células y producción de progesterona en comparación a la adición de solo insulina (Laughout *et al.*, 1991).

Es importante resaltar que cualquier animal que sea considerado para un programa de inseminación o superovulación debe estar bajo un adecuado régimen nutricional y de bienestar animal, esto permitirá incrementar las concentraciones de insulina, favoreciendo la función reproductiva, y como resultado el incremento en las concentraciones de progesterona (Cooke *et al.*, 2012).

En el presente estudio no se encontraron efectos persistentes de la administración de 500 mg de rbST en el momento del servicio sobre las concentraciones plasmáticas de IGF-1, ya que únicamente el día 3 del muestreo se observó un incremento agudo en el grupo tratado (27.88 ± 2.16 ng/ mL⁻¹) comparado con el grupo testigo (9 ± 2.56 ng/ mL⁻¹; $p < 0.05$). Aunque transitorio, dicho efecto pudo haber sido importante para el desarrollo embrionario ya que ocurrió 4 días después de la aplicación de rbST, momento en que los embriones se encontraban con un estado de desarrollo de 8-16 blastómeros (IETS, 1987). Este incremento en las concentraciones de IGF-1, ocurrió en un momento crítico en el desarrollo del embrión, ya que es justo antes de que ocurra la primera diferenciación en las dos líneas celulares: masa celular interna y trofoblasto (Niemann *et al.*, 2002; Velazquez *et al.*, 2012).

En general en este estudio los niveles de IGF-1 no coinciden con los reportados por otros autores (Gong *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 1993; Kuehner *et al.*, 1993). Las

concentraciones de IGF-1 durante todo el muestreo se encontraron muy por debajo de los valores reportados en vacas donadoras tratadas con rbST en un programa de superovulación. Cooke *et al.* (2012) reportaron que novillas tratadas con 250 mg de rbST cada 14 días presentan concentraciones de IGF-I de 248 ng/ml, comparadas con los 27.88 ± 2.16 ng/ mL⁻¹ que reportó el grupo rbST del presente trabajo. Sin embargo, los valores de IGF-1 encontrados si coinciden con los reportados en trabajos previos con vacas en diferentes etapas de producción que no han recibido tratamiento con rbST (4-12 ng/ mL⁻¹; Galvis *et al.*, 2003). Houseknecht *et al.* (1988) mencionaron que el estado nutricional es el principal factor que controla las concentraciones y actividad de IGF-1, ya que los niveles bajos de IGF-1 pueden estar asociados a dietas bajas en energía. Sin embargo, en el presente estudio no es posible asegurar que los animales presentaban un balance energético negativo, ya que la dieta cumplía con los requerimientos nutricionales y la condición corporal de todos los animales donadores se encontraba entre 3.0 a 3.5, que se considera óptima para realizar un programa de superovulación. Por otra parte, los cambios en las concentraciones de IGF-I también pueden ser resultado de una modificación en la síntesis y secreción hepática del propio IGF-I o de las proteínas ligadora. Se ha demostrado que éstas proteínas incrementan la vida media de IGF en sangre (Vicini *et al.*, 1991).

Con el incremento en las concentraciones de IGF-1, que se presentó el día 3 del muestreo, aparentemente fue suficiente para que el porcentaje de supervivencia embrionaria, desarrollo embrionario y de embriones transferibles fuera diferente ($p < 0.01$) entre grupos (cuadro 6.1 y 6.2). Moreira *et al.* (2002b) encontraron que la adición de GH e IGF-I a medios de maduración *in vitro* para ovocitos favoreció el desarrollo embrionario temprano, obteniendo un mayor porcentaje de blastocistos, sin embargo al adicionar anticuerpos para IGF-1, el desarrollo embrionario temprano no se vio afectado. Esto sugiere que el efecto de la rbST sobre el desarrollo embrionario puede ocurrir aunque la elevación en las concentraciones de IGF-1 no sean sostenidas, como ocurrió en el presente estudio, debido a que la GH tiene efectos

directos sobre las primeras etapas de la vida del embrión por la presencia de sus receptores en células del *cumulus* y ovocitos (Izadyar *et al.*, 1997; Kolle *et al.*, 1998).

8. CONCLUSIÓN

La aplicación de 500 mg de rbST el día de la inseminación artificial en un programa de superovulación en ganado *Bos indicus* incrementó el porcentaje de recuperación (embriones recuperados /cuerpos lúteos), el porcentaje de blastocistos y blastocistos expandidos en el día de la recolección, así como el número de embriones trasferibles y disminuyó la mortalidad embrionaria. Estos efectos se asociaron con incrementos en las concentraciones de progesterona e insulina durante varios días, así como con un incremento transitorio en las concentraciones de IGF-1.

9. LITERATURA CITADA

Advis J.P., White S.S., Ojeda S.R. Activation of growth hormone short loop negative feedback delays puberty in the female rat. *Endocrinology*. 1981; 108:1343-1352.

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 brahmán. *Rev. MVZ Córdoba*. 2006;11:766-772.

Ake L.J.R., Alfaro G.M.E., Aguayo A.A.M., Holy L., Concentración plasmática de progesterona y producción embrionaria, en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales. *Vet. Méx.* 1999; 30:19-23.

- Almeida R.A., Moraes F.A., Ferreira W.S., Moreira V.J.H., Almeida C.L.S., Polisseni J., Henry M. Efeito da somatotropina na população folicular, resperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Gyr. Rev. Bras. Zoot. 2007; 36:380-386.
- Augustin R., Pocar P., Wrenzycki C., Niemann H., Fischer B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro* . Reproduction. 2003; 126: 91-99.
- Azza H.A., Khalil A.S., El-Hamamsy H.T., Ezzo O.H. The effect of recombinant bovine somatotropin administration on milk production, some hemato-biochemical parameters and reproductive performance of lactating cows. Global Veterinaria. 2010; 4: 366-373.
- Bado A. Levasseur S., Attoub S., Kermorgant S., Laigneau .P. Bortoluzzi M.N. Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y., Lewis M.J. The stomach is a source of leptin. Nature. 1998; 394: 790-793.
- Ballesteros M., Leung K.C., Ross R.J.M., Lismaa T.P., Ho K.K.Y. Distribution and abundance of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor isoforms in human tissues. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2000; 85: 2865-2871.
- Barros C.M., Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. Theriogenology. 2001; 56: 1483-1496.
- Baruselli P.S., Marques M.O., Reis E.L., Nasser L.F.T.,Silvia R.C.P., Menegatti J.A. Adequação da dose de FSH (Folltropin-V) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo. Acta Sci. Vet. 2003; 31: 244-255.
- Baruselli P.S., Sá Filho M.F., Martins C.M., Nasser L.F., Nogueira M.F.G., Barros C.M. Bó G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. Theriogenology. 2006; 65:77-88.
- Bauman D.E. Bovine somatotropin: Review of an emerging animal technology. J. Dairy Sci. 1992; 75: 3432-3451.
- Bauman D.E., Peel C.J., Steinhour W.D., Reynolds P.J., Tyrrell H.F., Brown A.C.G., Haaland G.L. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: influence on rates of irreversible loss and oxidation of glucose and nonesterified fatty acids. J. Nutr. 1988; 118: 1031-1040.
- Baumann G. Growth hormone binding protein. J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 2001; 14; 355-375.

Benyei B., Komlosi I., Pécsi A., Kulcsar M., Huzsvai L., Barros CW., Huszenicza G. Plasma progesterone, metabolic hormones and beta-hidroxybutyrate in Holstein-Friesian cows after superovulation. *Acta Vet. Hungar.* 2011; 59: 485-495.

Bilby C.R., Bader J.F., Salfer B.E., Youngquist R.S., Murphy C.N., Garverick H.A., Crooker B.A., Lucy M.C. Plasma GH, IGF-I and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. *Theriogenology.* 1999;51: 1285-1296.

Bó G.A., Carballo G.D., Tríbulo A., Tríbulo H. Tríbulo R., Rogan D., Mapletoft R.J. New approaches to superovulation in the cow. *Reprod., Fertil. Develop.* 2010; 22: 106-112.

Boland M.P., Lonergan P., O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology.* 2001; 55: 1323-1340.

Borges A.M., Alves T.C.A., Mendes R.J.R., Rocha J.V.R., Ribeiro C.G., Corrêa B.J. Concentração plasmáticas de progesterone e metabólitos lipídicos em novilhas mestiças tratadas ou não com hormônio de crescimento e superovuladas. *Rev. Bras. Zootec.* 2001;30: 1689-1696.

Brann D.W., Wade M.F., Dhandapani K.M., Mahesh V.B., Buchanan C.D. Leptin and reproduction. *Steroids.* 2002; 67: 94-104.

Buratini JR J., Price C.A. Visintin J.A., Bó G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology.* 2000; 54:421-431.

Byrne A.T., Southgate J., Brison D.R., Leese H.J. Regulation of apoptosis in the bovine blastocysts by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Mol. Reprod.* 2002; 62:489-495.

Carvalho J.B., Carvalho N.A., Reis E.L., Nichi M., Souza A.H., Baruselli P.S. Effect of early luteolysis in progesterone based time AI protocols protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology.* 2008; 69: 167-175.

Chase Jr C.C., Elsasser T.H., Spicer L.J., Riley D.G., Lucy M.C., Hammond A.C., Olson T.A., Coleman S.W. Effect of growth hormone administration to mature miniature Brahman cattle treated with or without insulin on circulating concentrations of insulin like growth-1 and other metabolic hormones and metabolites. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2011; 41:1-13.

Cioffi J.A., Van Blerkom J., Antezak M., Shafer A., Wittmer S., Snodgrass H.R. The expression of leptin and its receptors in preovulatory human follicles. *Mol Hum. Reprod.* 1997; 3: 467-472.

Cooke R.F., Cappelozza B.I., Reis M.M., Bohnert D.W., Vasconcelos J.L.M. Plasma progesterone concentration in beef heifers receiving exogenous glucose, insulin, or bovine somatotropin. *J. Anim.Sci.* 2012; 90(9):3266-3273.

Crystal J.K., Stacey J.W. Matthew C.C. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F_{2α}. *J. Dairy Sci.* 1997; 80:286-294.

Erb R.E., Gaverick H.A., Randel R.D., Brown B.L., Callahan C.J. Profiles of reproductive hormones associated with fertile and nonfertile insemination of dairy cows. *Theriogenology.* 1976; 5: 227-241.

Etherton TD., Bauman D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 745-761.

Fernandes M.P.A., Da Costa E.P., Carvalho F.A.C. Rêgo p.t.a., Moura N.A.J.R. Magalhães S.G. Inovação de embriões bovinos recém-colhidos em receptoras tratadas com rbST no dia do estro. *R. Bras.Zootec.* 2009; 38:462-466.

Galvis R.D., Zoot M.S., Corres H.J., Zoot M.S., Ramírez N.F. Interacciones entre el balance nutricional, los indicadores del metabolismo energético, proteico y las concentraciones plasmáticas de insulina, e IGF-I en vacas en lactancia temprana. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 2003; 16: 237-248.

Geisert R.D., Lee C.Y., Simmen F.A., Zavy M.T., Fliss A.E., Bazer F.W., Simmen R.C.M. Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor I-II, and insulin like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 1991; 45:975-983.

Ginther O.J., Knopf L., Kastelic J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *Journal Reproduction and Fertility.* 1989; 87: 223-230.

Gong J.G., Bramley T., Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. *Biol. Reprod.* 1991; 45:941-949.

Gong J.G., Bramley T.A., Wilmut I., Webb R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol. Reprod.* 1993; 48: 1141-1149.

Gong J.G., Bramley T.A., Wilmut I., Webb R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FHS in heifers. *Theriogenology*. 1996; 45: 611-622.

Górlach, A. Evaluación embrionaria. Transferencia de Embriones en el Ganado Vacuno. Acribia S.A. Zaragoza España. 1997: 44-49.

Goto K., Nakanishi Y., Ohkutsu S., Ogawa K., Tasaki M., Ohta M. Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated japanese black cattle. *Theriogenology*. 1987; 27: 819-826.

Gradela A., Esper C.R., Rosa e Silva A.A.M. Plasma concentrations of 17β -estradiol and androstenedione and superovulatory response of nelore cows (*Bos indicus*) treated with FHS. *Theriogenology*. 1996; 45: 843-850.

Greenwood J., Gautier J. From oogenesis through gastrulation: developmental regulation of apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2005; 16: 215-224.

Harrison L.M., Randel R.D. Influence of insulin and energy intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 1986; 63: 1228-1235.

Herrier A., Einspanier R., Schams D., Niemann H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology*. 1994; 41: 601-611.

Herrler A., Einspanier R., Schams D., Niemann H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on follicular IGF-1 contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* 1994; 41: 601-611.

Herrler A., Hegele-Hartung C., Beier H.M. Immunohistological detection of IGF-1 in the rabbit oviduct and the uterus during early pregnancy. *Acta Endocrinol.* 1992; 126 (Suppl. 4): 79 abstr.

Herrington J., Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001; 12: 252-257.

Hyttel P., Callesen H., Greve T., Schmidt M., Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*. 1991; 35:91-108.

Houseknecht K.L., Boggs D.L., Campion D.R., Sartin J.L., Kiser T.E. Rampacek G.B., Amos H.E. Effect of dietary energy source and level on serum growth hormone, insulin-like growth factor 1, growth and body composition in beef heifers. *J. Anim., Sci.* 1988; 66: 2916-2923.

Houseknecht K.L., Portocarrerro C.P., Ji S., Lemenager R., Spurlock M.E. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-I expression. *J. Endocrinol.* 2000;164:51-57.

Hove K. Insulin secretion in lactating cows: responses to glucose infused intravenously in normal, ketonemic and starved animals. *J. Dairy Sci.* 1978; 61: 1407-1413.

Internacional Embryo Transfer Society. Manual of the international embryo transfer society. Chapter III. Identification, certification and registration. USA. May 1987: 39-43.

Izadyar F., Zhao J., Van Tol H.T.A., Colenbrander B., Bevers M.M. Synthesis of growth hormone in bovine ovary and in cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Theriogenology.* 1999; 51: 379 (abstract).

Izadyar F., Van Tol H.T.A., Hage W.G., Bever M.M. Pre-implantación bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during *in vitro* development. *Mol. Reprod. Dev.* 2000; 57: 247-255.

Izadyar F., Van Tol H.T.A., Colenbrander B., Bever M.M. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-1. *Mol. Reprod. Dev.* 1997; 47: 175-180.

Jensen A.M., Greve T., Madej A., Edquis L.E. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2 α treated cow. *Theriogenology.* 1982; 18:33-44.

Jousan F.D., Castro e Paula L.A., Block J., Hansen P.J. Fertility of lactating dairy cows administered recombinant bovine somatotropin during heat stress. *J. Dairy Sci.* 2007; 90: 341-351.

Kirkwood R.N., Thacker P.A., Guedo G.D., Laauveld B. The effect of exogenous growth hormone on the endocrine status and the occurrence of estrus in gilts. *Can. J. Anim. Sci.* 1989; 69:931-937.

Kolle S., Sinowatz F., Boie G., Lincoln D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 1998; 59: 836-842.

Kopchick J.J., Andry J.M. Growth hormone (GH), GH receptor and signal transduction. *Mol. Genet. Metab.* 2000; 71:293-314.

Kuehner L.F., Rieger D., Watson J.S., Zhao X., Johnson W.H. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated holstein heifers. *Theriogenology.* 1993; 40: 1003 -1013.

Laughout D.J., Spicer L.J. Serum-free culture of bovine granulosa cells (GC) effects of bovine growth hormone (GH) on proliferation and steroidogenesis *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 1990. 68 (suppl.):455(abstract 537).

Laughout D.J., Spicer L.J., Geisert R.D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: Effects of growth hormone, estradiol and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J. Anim. Sci.* 1991; 69:3321-3334.

León H.V., Hernandez-Cerón J., Keisler D.H. Gutierrez C.G. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J. Anim. Sci.* 2004; 82: 445-451.

Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., Kruif de A., Genicot G., Van Soom A. Non- esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction.* 2005; 130: 485-495.

Leroy J.L., Opsomer G., Van Soom A., Goovaerts I.G., Bols P.E. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high yielding dairy cows. *Reprod Domest. Anim.* 2008; 43: 612-622.

Leung K.C., Johannsson G., Leong G.M., Ho K.K.Y. Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocrine Reviews.* 2003; 25: 693-721.

Lindner M.G., Wright W.R.Jr. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 1983; 20: 407-416.

Lucy M.C., Collier R.J., Kitchell M.L., Dibner J.J., Hauser S.D., Krivi G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 1993; 48: 1219-1227.

Lucy M.C., Thatcher W.W., Collier R.J., Simmen F.A., Ko Y., Savio J.D., Badinga L. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1995; 12: 73-82.

Lucy M.C., Boyd C.K., Koenigsfeld A.T., Okamura C.S. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissue. *J. Dairy Sci.* 1998; 81:1889-1895.

Lucy M.C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Suppl.* 2004; 61: 415-427.

Lucy M.C. Funcional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* 2008; 43: 31-39.

Mann G.E., Mann S.J., Lamming G.E. The inter-relationship between maternal hormone environment and the embryo during early stages of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 1996; 21: 37-49.

Mejía O., Palma-Irizarry M., Rosas J., Madrid-Marina V., Valencia MJ, Zarco L. Administration of recombinant bovine somatotropin (rbST) at the time of breeding in superovulated fertile and subfertile ewes. *Small Rumin. Res.* 2012; 102:51-56.

Micke G. C., Sullivan M. J., McMillen J. C., Gentili S., Perry V. L. A. Heifer nutrient intake during early- and mid-gestation programs adult offspring adiposity and mRNA expression of growth-related genes in adipose depots. Reproduction. 2011;141: 697-706.

Milvae R.A., Hilnckley S.T., Carlson J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology.* 1996; 45: 1327-1349.

Mizuta K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*). 2003. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade e São Paulo.

Morales R.S. Efecto de un tratamiento corto de somatotropina bovina sobre niveles hormonales, actividad ovárica y desarrollo embrionario en hembras Holstein (Tesis de doctoral). México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.

Morales-Roura J.S., Zarco L., Hernández-Cerón J., Rodríguez G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropina at estrus on conception rate and luteal function of repet-breeding dairy cows. *Theriogenology*. 2001; 55: 1831-1841.

Moreira F., Orladi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F., Thatcher W.W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2001; 84: 1646-1659.

Moreira F., Badinga L., Burnley C., Thatcher W.W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*. 2002a; 57: 1371-1387.

Moreira F., Paula-Lopes F.F.P., Hansen P.J., Badinga L., Thatcher W.W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology*: 2002b; 57: 895-907.

Moreira P.S.A., Polizel-Neto A., Mendes J.A., Silveira A.C., Chardulo L.A.L. Recombinant bovine somatotropin (rbST) administration in Simbrasil calves and its effects on muscle fiber and T3, T4 and IGF-1 hormonal pattern. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 2010; 11:68-78.

Navarrete-Sierra L.F., Cruz T.A.A., González P.E.I., Piña A.R.E., Sangines G.J.R., Toledo L.V., Ramón U.J.P. Effect of recombinant growth hormone (sbST) application on superovulatory response and embryo viability in hair ewes. *Revista Científica*. 2008; 18: 175-179.

Neathery M.W., Crowe C.T., Hartnell G.F., Veenhuizen J.J., Regan J.O., Blackmon D.M. Effects of sometribove on performance, carcass composition and chemical blood characteristics of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 1991; 74: 3933-3939.

Niemann H. Better results from the superovulation of donor cows. *Tierzuchter*. 1991; 43: 34-35.

Niemann H., Wrenzycki C., Lucas-Hahn A., Brambrink T., Kues W.A., Carnwath J.W. Gene expression patterns in bovine *in vitro*-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells*. 2002;4:29-38.

Nogueira M.F.G, Barros B.J.P., Teixeira A.B., Trinca L.A., D'Occhio M.J., Barros C.M. Embryo recovery and pregnancy rates alter the delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*. 2002; 57: 1625-1634.

Nunes P.I., Gonçalves N.W., Negrão J.A., Rigolon L.P., Schiller S.S., Doi S.M.L., Pessini G.L. Somatotropina bovina recombinante (rBST) nos aspectos hematológico e metabólicos do sangue de novilhas (1/2 nelore x 1/2 red angus) em confinamento. R. Brás. Zootec. 2003; 32: 465-472.

Ovesen P., Vahl N., Fisker S., Veldhuis J.D., Christianses J.S., Jorgensen J.O. Increased pulsatile, but not basal, growth hormone secretion rates and plasma insulin-like growth factor I levels during the periovulatory interval in normal women. J. Clin Endocrinol. Metab. 1998; 83: 1662-1667.

Pershing R.A., Lucy M.C., Thatcher W.W., Badingal L. Effects of BST on oviductal and uterine genes encoding components of the IGF system in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 2002; 85: 3260-3267.

Ramos A.F., Neves E.F., Marques V.S., Lima F.P.C., Druma D.L., Marques A.P. Efeito de diferentes protocolos de superovulação sobre a concentração plasmática de progesterona e metabolitos lipídicos de vacas Nelore. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2007; 2: 273-279.

Randel R.D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). Theriogenology. 1984; 21:170-185.

Rieger D., Walton J.S., Goodwin M.L., Johnson W.H. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated holstein heifers. Theriogenology. 1991; 35: 863-868.

Rodríguez C.O.A., Díaz B.R., Gonzalez O.O., Gutiérrez C.G., Montaldo H.H., García O.C., Hernández C.J. Conception rate at first service in Holstein cows treated with bovine somatotrophin at time of insemination. Vet. Méx. 2009; 40: 1-7.

Sá Filho M.F., Carvalho N.A.T., Gimenes L.U., Torres-Júnior J.R., Nasser L.F.T., Tonhati H., Garcia J.M., Gasparrini B., Zicarelli L., Baruselli P.S. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. Anim. Reprod. Sci. 2009; 113: 51-59.

Sá Filho M.F., Sales N.J.N., Crespaldi G.A., Baruselli S.P. IATF em femeas *Bos indicus* em condicoes tropicais, 4º Simpósio Internacional de Reproducao Animal Aplicada. 23, 24, 25 de septiembre. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Sao Paulo Brasil, 2010.

Schams D., Berisha B. Regulation of corpus luteum function in cattle and overview. *Reprod. Domestic. Anim.* 2004; 39: 241-251.

Schams D., Kosmann M., Berisha B., Amselgruber W.M., Miyamoto A. Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Experimental Clinical Endocrinology Diabetes.* 2001; 109: 155-162.

Schwartzbauer G., Menon R.K. Regulation of growth hormone receptors gene expression. *Mol. Genet. Metab.* 1998; 63: 243-253.

Sechen S.J., McCutcheon S.N., Bauman D.E. Response to metabolic challenges in early lactation dairy cows during treatment with bovine somatotropin. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1989; 6: 141-154.

Sreenan J.M., Diskin M.G., Morris D.G. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. 2001; 26: 93-104.

Sosa C., Carriquiry M., Chalar C., Crespi D., Sanguinetti C., Cavestany D., Meikle A. Endometrial expression of leptin receptors and members of the growth hormone-insulin-like growth factor system throughout the estrous cycle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 2010;122:208-214.

Songsasen N., Yiengvisavakul V., Buntaracha B., Pharee S., Apimeteetumrong M., Sukwongs Y. Effect of treatment with recombinant bovine somatotropin on responses to superovulatory treatment in swamp buffalo. *Theriogenology.* 1999; 52: 377-384.

Spicer L.J., Echtenkamp S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1995; 12: 223-245.

Spicer L. J., Francisco C.C. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 207-212.

Squires E.J. Manipulación del crecimiento y composición de la canal. En: *Endocrinología Animal Aplicada.* Acribia S.A. Zaragoza, España. 2006a: 114-117.

Squires E.J. Manipulación del crecimiento y composición de la canal. En: *Endocrinología Animal Aplicada.* Acribia S.A. Zaragoza, España. 2006b: 120.

Stevenson K.R., Gilmour R.S., Wathes D.C. Localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and -II messenger ribonucleic acid and type I IGF receptors in the ovine uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology.* 1994; 134: 1655-1664.

Tazarona A.M., Olivera-Angel M., Lenis Y.Y. Rol de la mitocondria en el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. Arch. Med. Vet. 2010; 42: 125-133.

Velazquez M.A., Hadelar K.G. Hermann D., Kues W.A. Rémy B., Beckers J.F. Nieamann H. *In vivo* oocyte IGF-I priming increases inner mass proliferation of *in vitro*-formed bovine blastocysts. Theriogenology. 2012; 78: 517-527.

Velazquez R.L.E., Fregoso A.C., López O.R., Hernández C.J. Respuesta estral y porcentaje de concepción en vacas *Bos taurus-Bos indicus* posparto, tratados con la hormona bovina de crecimiento en un programa de inducción de la ovulación con progestágenos y eCG. Vet. Méx.. 2011; 42: 245-251.

Velazquez M.A., Newman M., Christie M.F., Cripps P.J., Crome M.A., Smith R.F., Dobson H. The usefulness of single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. Theriogenology. 2005; 64:1977-1994.

Wolfenson D., Inbarra G., Rotha Z., Kaimb M., Blocha A. Braw-Tal R. Follicular dynamic and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. Theriogenology. 2004; 62: 1042-1055.

Vicini J.L., Bounomo F.C. Veenhuizen J.J., Miller M.A., Clemmons D.R. Collier R.J. Nutrient balance and stage of lactation affect responses of insulin, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows. J. Nutr.. 1991; 91: 1656-1664.

Watson A.J., Hogan A., Hahnel A., Weimer K.E., Schultz G.A. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the pre-implantation bovine embryo. Mol. Reprod. Dev. 1992; 31: 87-95.

William G.L., Amstalden M., García M.R. Stanko R.L., Nizielski S.E. Morrison C.D. Keisler D.H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. Domest. Anim. Endocrinol.. 2002; 23: 339-349.

Yu W.H., Kimura M., Walczewska A., Karanth S., Mc Cann S.M. Role of leptine in hypothalamus. Horm. Metab. Res. 1993; 31: 345-350.

Zachow R.J., Maggoffin D.A. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor- I on FSH dependent 17 β -estradiol production by rat ovarian granulosa cell. Endocrinology. 1997; 1378: 847-850.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Freidman J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372: 425-432.