

01669



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE SOMATOTROPINA BOVINA AL TRATAMIENTO DE FOLLTROPIN-V SOBRE LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA Y CANTIDAD DE EMBRIONES TRANSFERIBLES EN VACAS CEBUINAS SUPEROVULADAS EN DOS ÉPOCAS DEL AÑO EN EL TRÓPICO HÚMEDO MEXICANO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
P R E S E N T A :
MVZ. JUAN JOSÉ MOLINA ECHEVERRI

276943

ASESORES: DR. CARLOS S. GALINA H.
DR. HÉCTOR BASURTO C.
DR. CARLOS GUTIÉRREZ A.



MÉXICO

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

Página

INDICE DE CUADROS.....	1
INDICE DE FIGURAS.....	1
RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCION.....	7
2 REVISION DE LITERATURA.....	7
2.1 Crecimiento folicular y superovulación.....	7
2.2 Somatotropina bovina.....	13
2.3 Estacionalidad de los cebuinos.....	16
2.4 Clasificación de embriones.....	18
3 HIPOTESIS.....	26
4 OBJETIVOS.....	26
5 MATERIALES Y METODOS.....	26
5.1 Localización.....	26
5.2 Unidades experimentales.....	27
5.3 Metodología.....	28
6 ANALISIS ESTADISTICO.....	30
7 RESULTADOS.....	33
7.1 Dinámica folicular.....	33
7.2 Respuesta a sincronización.....	36
7.3 Respuesta superovulatoria.....	37
7.4 Recuperación de estructuras y embriones transferibles.....	41
8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	49
8.1 Dinámica folicular.....	49
8.2 Sincronización.....	51
8.3 Respuesta superovulatoria.....	52
8.4 Estructuras recuperadas.....	55
8.5 Embriones transferibles.....	58
9 BIBLIOGRAFIA.....	62

INDICE DE CUADROS

CUADROS		Página
1	Desarrollo embrionario bovino hasta el día 9.....	20
2	Guía para la clasificación de embriones recomendada por la sociedad internacional de transferencia de embriones (IETS).....	21-22
3	Esquema del programa superovulatorio en los tratamientos (Epoca de secas).....	31
4	Esquema del programa superovulatorio en los tratamientos (Epoca de lluvias).....	32
5	Respuesta superovulatoria en ambas épocas	38
6	Conteo de estructuras recuperadas en ambas épocas.....	42
7	Conteo de embriones transferibles en ambas épocas.....	42
8	Evaluación de la respuesta de acuerdo a conteo de embriones/óvulos en la época de secas.....	43
9	Evaluación de la respuesta de acuerdo a conteo de embriones/óvulos en la época de lluvias.....	45
10	Resultados de lavados uterinos para colección de embriones (Epoca de secas).....	47
11	Resultados de lavados uterinos para colección de embriones (Epoca de lluvias).....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Dinámica folicular durante el ciclo estral en hembras Nelore.....	9
2	Ejemplo de desarrollo y calidad de embriones bovinos.....	23
3	Población folicular (clase 1, 2 y 3) en el lote de tratamiento y lote testigo de acuerdo a la media obtenida por vaca/día en la época de secas.....	34
4	Población folicular (clase 1, 2 y 3) en el lote de tratamiento y lote testigo de acuerdo a la media obtenida por vaca/día en la época de lluvias.....	35
5	Evaluación de la respuesta de acuerdo a conteo de cuerpos lúteos en la época de secas.....	39
6	Evaluación de la respuesta de acuerdo a conteo de cuerpos lúteos en la época de lluvias.....	40
7	Evaluación de la respuesta de acuerdo a conteo de embriones transferibles en la época de secas.....	44
8	Evaluación de la respuesta de acuerdo a conteo de embriones transferibles en la época de lluvias.....	46

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Jorge Avila García por su importantísima ayuda sin la cual no hubiera sido posible realizar el presente trabajo, de igual forma por la forma desinteresada con la que me brindó su amistad, conocimientos teóricos y experiencia práctica en el campo de la producción y reproducción bovina, los cuales tendré en mente durante el resto de mi vida profesional. De igual forma al “doctor Polo” por estar siempre dispuesto a colaborarme y enseñarme no solo durante el presente trabajo sino durante mi formación práctica en la maestría.

Al doctor Carlos Galina por su apoyo constante durante mi formación y por permitirme trabajar a su lado desarrollando al máximo mi potencial de trabajo.

Al doctor Héctor Basurto por brindarme su amistad y sus amplios conocimientos en el área de la reproducción bovina aplicada, experiencia importantísima para mi desempeño profesional. De igual forma al doctor Carlos Gutiérrez por estar siempre dispuesto a colaborar y corregir durante mi formación académica.

A Carolina por haber estado siempre a mi lado siendo no solo apoyo moral sino de trabajo al participar en la realización de los análisis estadísticos.

Al personal Académico del CEIEGT por estar siempre dispuestos a ayudar, de igual forma a los estudiantes y personal de campo que participaron en la realización del trabajo, sin los cuales hubiera sido imposible culminar el mismo.

A mis padres, hermanos y familiares, no solo por su apoyo económico sino por estar siempre animándome y apoyándome para terminar con éxito mis estudios de posgrado.

RESUMEN

JUAN JOSE MOLINA ECHEVERRI. Efecto de la adición de somatotropina bovina al tratamiento de Folltropin-V sobre la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en vacas cebuínas superovuladas en dos épocas del año en el trópico húmedo mexicano. (bajo la dirección de Carlos S. Galina H, Héctor Basurto C y Carlos Gutiérrez A.).

Con el fin de evaluar el efecto de la adición de somatotropina al tratamiento de Folltropin-V sobre la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en vacas cebuínas en dos épocas del año se superovularon 22 hembras Brahman entre 3 y 6 años de edad, con peso promedio de 450 kg y condición corporal entre 2.5 y 4. El trabajo se realizó en el CEIEGT FMVZ-UNAM con clima caliente, húmedo sin temporada seca definida (Afm we, García 1981), temperatura y precipitación promedio de 21.8 °C y 1780 mm anuales respectivamente. Se realizó seguimiento ultrasonográfico y muestreo sanguíneo cada tercer día para determinar los niveles de progesterona y la dinámica folicular en dos épocas del año. En la época de secas las vacas se sincronizaron con el protocolo Sincromate B (Meriel, México) por 9 días. Las vacas que demostraron signos de celo (día 0) se distribuyeron en el lote testigo y de tratamiento. El testigo se superovuló con 1.5 ml de Folltropin (Litton-México) 2 veces/día los días 9, 10, 11,12 y 13 (total 240 mg NIH-FSH-P1). La ovulación se logró con prostaglandina F2 α (Lutalyse, Upjhon-México) el día 12. El lote tratado recibió el mismo protocolo adicionado con 500 mg de Complejo de Somatotropina Bovina-Zinc (Monsanto-México) el día 4. En la época de lluvias se complementaron con un concentrado (14 % de PC y 2.8 Mcal ED/Kg, consumo de 0.5 % del peso vivo/día). Las vacas tratadas en la primera época fueron testigo y viceversa y recibieron el mismo protocolo sincronizador y superovulatorio. Los resultados se analizaron con estadística no paramétrica (Wilcoxon) y correlación de Spearman (paquete SAS; significancia con $p < 0.05$). El comportamiento folicular en ambos tratamientos y épocas no presentó diferencias significativas. De igual forma la población folicular clase 1 (<4mm) el

día 9 no se relacionó con la respuesta superovulatoria en ambas épocas. De acuerdo a la progesterona, en la época de secas se encontraba el 62 % de las hembras en anestro y el 38 % ciclando mientras que en la época de lluvias 18 y 82 % respectivamente sin haber diferencias estadísticas en sus respuestas en ambas épocas. No hubo diferencias estadísticas en la respuesta superovulatoria entre el lote testigo y de tratamiento dentro de cada época.. Sin embargo, si existió una diferencia significativa entre los testigos en ambas épocas y entre el lote testigo en la época de secas y el tratamiento en lluvias. En embriones transferibles en la época de secas no hubo diferencias significativas, pero sí en lluvias. Se determinó que la somatotropina no aumentó la respuesta superovulatoria, pero sí el número de embriones transferibles en la época de lluvias en donde los animales recibieron complementación alimenticia. De igual forma el estado de los animales previo al tratamiento no afectó significativamente la respuesta superovulatoria

ABSTRACT

JUAN JOSE MOLINA ECHEVERRI. Effect of the addition of bovine somatotrophin to the treatment of folltropin-V in superovulatory response and the total number of transferable embryos in superovulated zebu cattle in two seasons in the wet tropics of Mexico. (Carlos S. Galina H, Héctor Basurto C y Carlos Gutiérrez A.).

The aim of this study was to investigate if the addition of bovine somatotrophin to the treatment of Folltropin-V increased the superovulatory response and the total number of transferable embryos during two seasons in the wet tropics of Mexico. A total of 22 non-lactating zebu cows (more than 6 years old) were used in this experiment. The cows were in good health and body condition score between 2.5 to 4 on a scale from the 1 to 5. The experiment was undertaken at the Center For Research, Teaching and Extension in Tropical Animal Production of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Mexico. This center is located in the State of Veracruz, at 20 04' latitude North and 97 03' longitude west, classified as humid tropics (Garcia 1981).

In the dry season the twenty- two cows were divided into two groups. In the first one (control group) the cows were synchronized using Synchronate B (Meriel, México) for 9 days and a prostaglandin injection (Lutalyse-Upjohn, México) at the moment of implant withdrawal. Approximately two days later, the cows were expected to be in estrus (from then on day 0). The superovulatory treatment began nine days later (day 9) with Folltropin-V (Litton, México) in decreasing dosage during 5 days (total dosage:240 mg NIH-FSH-P1). On day 12, prostaglandin was injected. The next two days after finishing Folltropin-V application, observation for signs of estrus were carried out continuously (standing to be mounted was taken as an indicator of estrus). Artificial insemination was carried out at 8 and 20 hours. In the second group (treatment group) the cows received the same treatment and in addition, they were given bovine somatotrophin (500mg. SC) for four days after the expression of estrus, equivalent to 5 days prior before the superovulatory treatment. In the

wet season the cows that had received the somatotrophin in the dry season were the control group in a single reverse trial. In this part cows were supplemented with 2.8 Mcal ED/kg and 14% CP (at 0.5 % of LW daily).

Data were analyzed by non-parametric statistics (Wilcoxon). The Spearman correlation test available from the SAS package using a level of significance of <0.05 were used to compare results. There were no differences in the follicular growth pattern between treatments neither between seasons. Also class 1 follicular population (< 4 mm) on day 9 were not correlated with the superovulatory response. According to progesterone concentrations, 62% were non-cycling cows and 38% were cycling in the dry season but in the wet season changed to 18 and 82% respectively. Responses were no different between them in both seasons ($p>0.05$). There were no differences in superovulatory response between control and treatment groups by season ($p>0.05$; 73 and 53 corpus luteum in the dry season and 93 and 96 in the wet). However there were differences between control groups in both seasons ($p<0.05$; 53 corpus luteum in the dry season and 96 in the wet). Also there were differences between control group in the dry season and treatment group in the wet ($p<0.05$; 53 corpus luteum in the dry season and 93 in the wet). According to transferable embryos, there were no differences in the dry seasons ($p>0.05$; 9 embryos for the treatment group and 11 for the control), but there were in the wet ($p<0.05$; 26 and 2 respectively). Data suggest that somatotrophin did not enhance the superovulatory response but increased the total number of transferable embryos in the wet season where the cows were supplemented.

1. INTRODUCCION

El crecimiento acelerado de la población mundial ha creado la necesidad de incrementar la producción de alimentos de origen animal. Dentro de estos alimentos, la carne y leche bovinas constituyen los productos de mayor importancia.

Durante los últimos años, los sistemas de producción bovina han venido sufriendo un constante proceso evolutivo, encaminado tanto al mejoramiento de la cantidad como de la calidad del producto, de tal manera que se satisfagan cada vez mejor las necesidades del mundo actual. En la búsqueda de mejorar esos procesos productivos se ha generado tecnología encaminada a mejorar la alimentación, sanidad y el manejo genético animal, siendo este último un factor realmente importante si se quiere culminar con éxito cualquier proceso productivo animal. Uno de los mayores adelantos en el mejoramiento de los grupos genéticos lo constituye la inseminación artificial, con la cual se facilita la difusión de material genético de alta calidad. De igual manera las explotaciones en nuestros países cuentan con hembras de excelentes niveles productivos tanto en leche como en carne y/o terneros producidos. Asimismo existen hembras con características fenotípicas excelentes, determinadas en los diferentes juzgamientos que tienen lugar en las ferias ganaderas existentes en todo el mundo.

Con el objetivo de obtener un mayor número de hijos de hembras de elevada calidad fenotípica y/o económica, se desarrolló la técnica de transferencia de embriones. Con esta técnica se ha logrado aumentar su progenie por año de 1 hasta 10 ó 15 hijos, logrando así un avance realmente importante en la calidad de los hatos existentes en corto plazo. Otra ventaja que se tiene con la implementación de esta técnica es de orden económico ya que los criadores de animales puros de registro aumentan sus ingresos al obtener hijos de hembras fenotípicamente superiores. De igual manera es posible aumentar el número de

crías de animales de razas exóticas, las cuales han venido aumentando en los últimos años. Sin embargo una de las principales limitantes para la aplicación generalizada de la transferencia de embriones es el costo elevado; sin embargo esto ha generado que su campo de aplicación sea solo para aquellos animales cuyos hijos tengan un valor económico elevado de tal manera que puedan ser redituables los costos de la operación. Al respecto Madalena (1993) reportó que el costo para producir un embrión en los Estados Unidos es de 50 dólares aproximadamente y que el costo para producir un animal adulto procedente de trasplante de embriones (manteniendo una eficiencia alta del proceso; 5 embriones transferibles por lavado, 50 % de supervivencia y mortalidad pos nacimiento inferior al 2 %) es de 350 dólares, valor similar al costo de producción de animales convencionales. En México, Avila (comunicación personal) reporta valores similares, dando una gran importancia a los costos originados por el mantenimiento de las receptoras en el hato.

No obstante que la tecnología de la transferencia embrionaria ha avanzado considerablemente en los últimos años, los resultados aun no son homogéneos, por lo que futuras investigaciones deben enfocarse hacia dos aspectos principalmente, uno es aumentar el porcentaje de gestaciones obtenidas con los embriones procedentes de vacas superovuladas y otro es mejorar la respuesta superovulatoria de las vacas donadoras de embriones para obtener un mayor número de embriones transferibles y así aumentar el número total de crías obtenidas por animal por año. A este respecto, algunos investigadores han propuesto una gran variedad de opciones para aumentar la respuesta superovulatoria, una de estas es aumentar la cantidad de folículos presentes en el ovario al momento de empezar el proceso superovulatorio con lo cual se podría mejorar los resultados. Se ha propuesto que la somatotropina, al inducir la síntesis de Factores de crecimiento (IGF's) puede incrementar la cantidad de folículos pequeños en los ovarios ya que estos tienen un efecto marcado en las primeras etapas de la foliculogénesis. Por otra parte, existen opiniones encontradas sobre la variabilidad que puede tener la respuesta al estar influida por la época del año en que se realiza la superovulación, presentando respuestas inferiores en las épocas de secas y nortes y superiores en la época de lluvias.

El presente trabajo pretende probar si la adición de somatotropina bovina al tratamiento superovulatorios en vacas cebuínas mejora la respuesta y aumenta la cantidad de embriones transferibles en dos épocas del año.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 CRECIMIENTO FOLICULAR Y SUPEROVULACION

Las hembras mamíferas poseen al nacimiento un número determinado de folículos primordiales (alrededor de 200.000) constituidos por un ovocito rodeado por células de la granulosa. Estos folículos inician su crecimiento, desarrollo y ovulación o atresia a lo largo de la vida de la hembra. En animales prepúberes el crecimiento final se encuentra interrumpido por diversos factores hormonales, entre ellos la falta de secreción pulsátil de Hormona Luteinizante (LH) debido a una alta sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa del estradiol, por lo que los folículos suspenden su crecimiento e inician el proceso de atresia sin tener oportunidad de llegar a la ovulación. En animales adultos, se pierde la sensibilidad hipotalámica a la retroalimentación negativa del estradiol por lo cual los folículos pueden lograr la ovulación (si no hay progesterona circulante) o atresia (Ginther *et al.*, 1996).

Bajo condiciones fisiológicas el crecimiento folicular en animales adultos incluye 2 fases: La primera se conoce como **etapa basal** y ocupa alrededor de 40 días; en esta los folículos crecen hasta alcanzar 4 mm de diámetro, su desarrollo está estrechamente relacionado con la tasa de proliferación de las células de la granulosa. De acuerdo con Monniaux *et al.*,

El presente trabajo pretende probar si la adición de somatotropina bovina al tratamiento superovulatorios en vacas cebuínas mejora la respuesta y aumenta la cantidad de embriones transferibles en dos épocas del año.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 CRECIMIENTO FOLICULAR Y SUPERÓVULACION

Las hembras mamíferas poseen al nacimiento un número determinado de folículos primordiales (alrededor de 200.000) constituidos por un ovocito rodeado por células de la granulosa. Estos folículos inician su crecimiento, desarrollo y ovulación o atresia a lo largo de la vida de la hembra. En animales prepúberes el crecimiento final se encuentra interrumpido por diversos factores hormonales, entre ellos la falta de secreción pulsátil de Hormona Luteinizante (LH) debido a una alta sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa del estradiol, por lo que los folículos suspenden su crecimiento e inician el proceso de atresia sin tener oportunidad de llegar a la ovulación. En animales adultos, se pierde la sensibilidad hipotalámica a la retroalimentación negativa del estradiol por lo cual los folículos pueden lograr la ovulación (si no hay progesterona circulante) o atresia (Ginther *et al.*, 1996).

Bajo condiciones fisiológicas el crecimiento folicular en animales adultos incluye 2 fases: La primera se conoce como **etapa basal** y ocupa alrededor de 40 días; en esta los folículos crecen hasta alcanzar 4 mm de diámetro, su desarrollo está estrechamente relacionado con la tasa de proliferación de las células de la granulosa. De acuerdo con Monniaux *et al.*,

(1997), esta fase no depende estrictamente de gonadotropinas sino de factores de crecimiento tales como los Factores de Crecimiento Similares a la Insulina I y II (IGF'S), Folistatina, Inhibina, Factor de Crecimiento Epidermal y Factor de Crecimiento de los Fibroblastos, los cuales son producidos en el ovario y algunos en el mismo folículo.

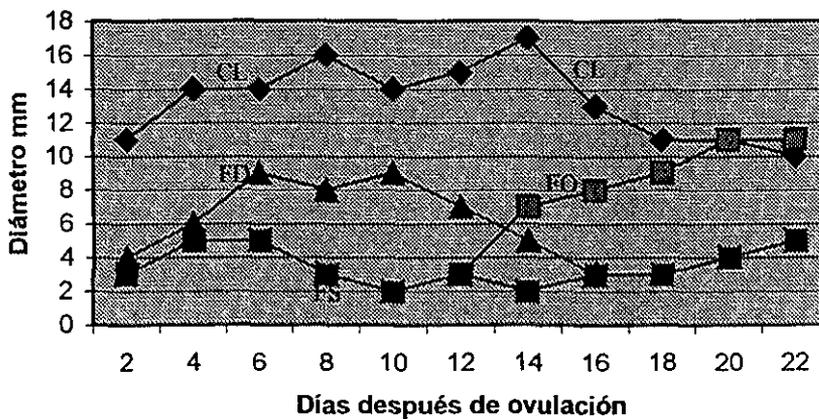
La segunda fase es conocida como **etapa tónica** y corresponde al desarrollo terminal de los folículos antrales hasta el estado preovulatorio. Durante esta fase el crecimiento se debe básicamente al ensanchamiento del antro folicular, además se caracteriza por aumento en la capacidad esteroidogénica y sensibilidad de las células de la granulosa a la hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Monniaux *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1999). Esta etapa está caracterizada por tres fases bien delimitadas que son: La *etapa de reclutamiento* en la cual inician su desarrollo un gran número de folículos, posteriormente sigue la *etapa de selección* en donde la mayoría de los folículos reclutados (folículos subordinados) inician los procesos de atresia, quedando solo uno de ellos que continuará el desarrollo hacia la *etapa de dominancia* quien, por un aumento en los receptores de FSH y LH, terminará de madurar impidiendo el reclutamiento de otro nuevo grupo de folículos para posteriormente ovular y liberar el ovocito que contiene o iniciar también los procesos de atresia si existe progesterona circulante (Lucy *et al.*, 1992; Webb *et al.*, 1999)

En el bovino las fases de reclutamiento, selección y dominancia ocurren en forma de oleadas u “ondas foliculares” en un mismo ciclo estral. Durante un ciclo estral pueden aparecer 2 ó 3 ondas foliculares aunque las vacas tienden a ser constantes en cuanto a la cantidad de ondas que presentan (Savio *et al.*, 1988; Ginther *et al.*, 1989 y Lucy *et al.*, 1992). Una onda de crecimiento folicular involucra el desarrollo sincrónico de un grupo o cohorte de folículos (Ginther *et al.*, 1989), los cuales inician su crecimiento al responder a una pequeña elevación de FSH que aparece el día de la ovulación o en el momento en que se atresia un folículo dominante. Los folículos reclutados continúan su crecimiento por

dominante. Los folículos reclutados continúan su crecimiento por acción de FSH hasta que alguno se hace dominante. Este causa la regresión de los otros folículos a través de mecanismos de retroalimentación negativa causados por la inhibina y el estradiol sobre el hipotálamo originando una disminución en los niveles de FSH circulantes (Barros *et al.*, 1995). Los bajos niveles de FSH son insuficientes para sustentar el crecimiento de los folículos subordinados pero no afectan el desarrollo final del folículo dominante el cual culminará en la ovulación en ausencia de progesterona circulante o atresia en presencia de cuerpo lúteo.

FIGURA 1

DINAMICA FOLICULAR DURANTE EL CICLO ESTRAL EN HEMBRAS NELORE (Adaptado de Barros *et al.*, 1995)



Hembra Nelore con 3 ondas de crecimiento folicular

CL: Cuerpo lúteo.

FO: Folículo ovulatorio.

FD: Folículo dominante.

FS: Folículos subordinados

subordinados) hasta la ovulación. Los tratamientos superovulatorios se inician generalmente entre los días 8 y 12 del ciclo estral (celo = día 0). El inicio de los tratamientos se basa en el comienzo de la maduración de una onda folicular. Lindsell *et al.*, (1986) demostraron que podía alcanzarse una respuesta superovulatoria mayor si los tratamientos estimulatorios se iniciaban el día 9 del ciclo (día 8 pos ovulación) comparada con la que se obtenía comenzando los días 3, 6 ó 12. Estas observaciones han sido corroboradas por recientes evidencias ultrasonográficas (Ginther *et al.*, 1989) en donde se demuestra que la segunda onda folicular comienza en promedio 8.5 días después de la ovulación (día 9.5 del ciclo) en las vacas de 3 ondas y 9.5 días pos ovulación (día 10.5 del ciclo) en las vacas de 2 ondas foliculares. De acuerdo con Ginther *et al.*, (1989), las vacas con 2 ondas de crecimiento folicular tienden a tener ciclos mas cortos (18 a 20 días) que las de 3 (21 a 23 días), por lo que en la práctica resulta útil conocer la longitud del ciclo estral previo para ajustar el tiempo de iniciación de los tratamientos superovulatorios.

El objetivo principal de los tratamientos superovulatorios es aumentar el número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez (Monniaux, Chupin y Saumande, 1983). La respuesta a estos tratamientos es muy variable y difícil de predecir. En un trabajo de 2048 superovulaciones realizado por Lerner *et al.*, (1986) obtuvieron promedios de 11.5 estructuras recuperadas y de 6.2 embriones transferibles por vaca; sin embargo, la variabilidad en la respuesta superovulatoria como en la calidad de los embriones fue muy alta. El 24% de las colecciones no tuvieron embriones viables, 64% de las donantes produjeron menos embriones que el promedio y solo el 30 % de las colecciones sumaron el 70% de los embriones.

La variabilidad de la respuesta ovárica se ha asociado con causas relacionadas a los tratamientos utilizados para inducir la superovulación, las preparaciones gonadotróficas (Monniaux, Chopin y Saumande, 1983), los lotes de gonadotropinas (Murphy *et al.*, 1984),

la duración del tratamiento (García, Seidel y Elsdén, 1982), el momento del tratamiento con relación al ciclo estral (Donaldson, 1984), dosis total de gonadotropinas (Mc Gowan *et al.*, 1985) y el uso de hormonas adicionales (Hafez, Sugie y Hunt, 1963). También hay otros factores importantes que son inherentes al animal y a su ambiente; por ejemplo, el estado nutricional, historia reproductiva, edad, estación del año, raza, estado ovárico al momento del tratamiento y efecto de repetición de tratamientos superovulatorios (Mapletoft *et al.*, 1990). Dentro de las hormonas utilizadas para realizar la superovulación se encuentra la Gonadotropina Coriónica de Yegua Preñada (PMSG) o eCG, la hormona menopáusica humana (HMG) y los extractos pituitarios de animales domésticos.

La PMSG (eCG) es una glicoproteína compleja con actividad de FSH y de LH. En la vaca tiene una vida media aproximada de 40 horas y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea, por esta razón normalmente se administra como dosis única, seguida por la aplicación de prostaglandinas 48 horas después. La vida media prolongada de la PMSG provoca una estimulación ovárica permanente ocasionando folículos que no ovulan, perfiles endocrinos anormales y embriones de mala calidad. Estos problemas se contrarrestan en gran medida con la administración de anticuerpos anti-PMSG en el momento de la primera inseminación (12 a 18 horas después de iniciado el celo). La dosis de PMSG recomendada oscila entre 1500 a 3000 UI por animal, usándose generalmente 2500 UI por vía intramuscular (Mapletoft *et al.*, 1990).

La Gonadotropina Menopáusica Humana (HMG) contiene aproximadamente la misma proporción de FSH y LH. Los resultados superovulatorios son similares a los obtenidos con FSH porcina pero con menor variabilidad en la respuesta comparada con la PMSG (McGowan *et al.*, 1985).

En los últimos años los extractos pituitarios de animales domésticos han ganado popularidad. Los tratamientos con estas hormonas incluyen dos inyecciones diarias durante 5 días y con dosificaciones que van desde 200 a 400 mg de NIH-FSH-P1 dependiendo de la

raza y talla de las vacas tratadas. La descarga de LH preovulatoria ocurre 24 a 36 horas después del comienzo del celo. Actualmente en la mayoría de los países se dispone de extractos pituitarios purificados a los cuales se le extrae más del 80 % de la fracción LH.

La investigación en los últimos años ha estado encaminada a regular la respuesta superovulatoria con regímenes que produzcan mayor homogeneidad en la maduración de los folículos. Uno de estos productos es el Folltropin-V (Vetrepharm). Este es un extracto de folitropina altamente purificado extraída de glándulas pituitarias porcinas. Este producto posee una relación baja entre FSH-LH (0.12%). De acuerdo con Mapletoft *et al.*, (1990), los bajos niveles de LH son benéficos ya que a altas concentraciones producen un deterioro en la calidad de los embriones. El uso de Folltropin-V en animales cebuinos ha ganado popularidad en los últimos años. Por ejemplo Silva *et al.*, (1996) compararon Folltropin-V frente a otros compuestos superovulatorios en 40 vacas Nelore, obteniendo 2.9 ± 2.97 embriones transferibles por lavado comparado con 5.5 ± 4.63 usando FSH-P (Schering), 3.6 ± 4.03 con Pluset (Serono), 3.83 ± 3.53 usando Super-OV (Ausa-international) y 4.6 ± 5.12 con Pergovet (Serono), sin embargo las diferencias aunque numéricas, no fueron significativas ($P > 0.05$).

Tribulo y Bo, (1991) sugirieron que las vacas *Bos indicus* son más sensibles a altos niveles de LH. A este respecto, Avila, (comunicación personal, México) y Munar y Nigro, (1989, datos de archivo Vetrepharm), recomendaron que este tipo de hembras deben ser tratadas con menor dosificación de FSH exógena, aproximadamente un 25 % menos de la dosis rutinaria para *Bos taurus*. Por otra parte Visintin *et al.*, (1996) encontraron una gran variación en la respuesta superovulatoria de vacas Nelore con diferentes dosificaciones de FSH-LH, encontrando 5.2 embriones viables con 300 mg de FSH-LH, comparado con 1.8 embriones viables usando 400 mg y 2.7 embriones viables con 500 mg.

El objetivo de los protocolos superovulatorios es obtener al menos 5 embriones transferibles por lavado. Este objetivo no ha sido alcanzado bajo condiciones tropicales. Por esto se ha experimentado en el ganado cebuino con varios elementos como son la variación en las dosis de hormonas foliculoestimulantes usadas (Bo *et al.*, 1996; Murphy y Pescador, 1997), la sincronización de acuerdo con las ondas foliculares (Adams *et al.*, 1992; Ginther *et al.*, 1996; Schmit *et al.*, 1996.), inmunización contra inhibina (Morris *et al.*, 1995), y el uso de la somatotropina (Gong *et al.*, 1996).

2.2 SOMATOTROPINA BOVINA

La somatotropina bovina es una cadena simple de polipéptidos compuesta por 191 aminoácidos, producida en la pituitaria anterior. Los aminoácidos que componen la somatotropina son diferentes de acuerdo a la especie; por ejemplo, la somatotropina bovina y la humana difieren un 35% en cuanto a sus aminoácidos pero la bovina y la ovina son casi idénticas (Bauman, 1992).

La somatotropina ha recibido gran atención y una vigorosa evaluación tanto en la literatura científica como en el área productiva, lo cual obedece principalmente a su introducción en la industria lechera incrementando la productividad de los animales entre 2 y 5 kg de leche por día (Burto, Macleod and McBride, 1990). Este incremento se debe a la interacción de diversos factores como son:

1. Aumento del flujo sanguíneo y aumento en la extracción de metabolitos circulantes.
2. Incremento en la disponibilidad nutricional al promover un aumento progresivo del apetito, con una movilización moderada de los depósitos de grasa, disminuyendo el uso metabólico de la glucosa y de los ácidos aminados, aumentando la gluconeogénesis hepática.

3. Aumento en la actividad secretora de los acines alveolares al elevar el metabolismo y aumentando la longevidad de estos acines (Fuentes, 1991).

Uno de los efectos secundarios interesantes de la administración prolongada de somatotropina en las vacas lecheras fue la aparición de partos gemelares. Cole *et al.*, (1991) reportaron tasas de partos gemelares del 10.2 % en vacas tratadas con somatotropina comparados con 4.75 % en grupos testigo ($P < 0.10$). Debido a estos resultados, se iniciaron estudios sobre el papel de la somatotropina en el desarrollo folicular. La investigación ha demostrado un incremento en el número de folículos antrales del rango de 2 a 5 mm de diámetro reclutados durante las ondas foliculares bovinas, sin alterar el patrón de secreción de gonadotropinas ni la secuencia de desarrollo de las ondas foliculares en el ovario, o los efectos inhibitorios del folículo dominante sobre los subordinados (Gong *et al.*, 1991).

Existe un argumento de un efecto directo de la somatotropina sobre los ovarios, que consiste en la presencia de receptores para esta hormona en el ovario bovino, sin embargo estos receptores parecen estar confinados al tejido luteinizado, y sólo raramente presentes en los folículos (Lucy *et al.*, 1992). Estudios *in vitro* en células de la granulosa demuestran que el efecto de la somatotropina sobre las mismas parece depender del grado de diferenciación que estas poseen. Gong *et al.*, (1994) comprobaron en bovinos que la somatotropina por sí sola incrementa la producción de progesterona por las células de la granulosa que han sufrido luteinización (células provenientes de folículos > 8 mm), mientras que no ejerce ningún efecto sobre aquellas células que no han sufrido luteinización (Gutiérrez, Campell y Webb, datos no publicados).

Otro efecto bien conocido de la somatotropina es la inducción de la síntesis y secreción hepática de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF'S; Gong *et al.*, 1991; De la Sota *et al.*, 1993;) y por el páncreas (Mcguire *et al.*, 1992). Los factores de crecimiento están directamente relacionados con la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, estimulando la morfogénesis, crecimiento celular, diferenciación y

mantenimiento de la homeostasis (Monget y Monniaux, 1995; Webb *et al.*, 1999). Los IGF'S son de gran importancia para el crecimiento folicular. El sistema de IGF's está compuesto por 2 factores (IGF-I, IGF-II) y seis proteínas ligadoras (IGF-BP). De acuerdo con Monniaux *et al.*, (1997), la foliculogénesis tiene dependencia marcada en los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF's) ya que intervienen directamente en el crecimiento de los folículos preantrales, convirtiéndose éste en el principal mecanismo de relación entre la respuesta ovulatoria y la somatotropina.

El IGF-I es de origen endocrino y actúa en el folículo estimulando la esteroidogénesis y la proliferación celular de las células de la granulosa (Gutiérrez *et al.*, 1997a). También se ha demostrado que el IGF-I estimula el desarrollo y formación del antro en folículos preantrales (Gutiérrez *et al.*, 2000). El IGF-II es de origen endócrino y autócrino en el folículo. En el bovino las células de la teca producen IGF-II (Gutiérrez *et al.*, 1996) que al igual que el IGF-I actúa sobre la esteroidogénesis y proliferación celular. Además de los IGF's, las proteínas ligadoras de IGF (IGF-BP) son también producidas en el ovario y por las células foliculares (Gutiérrez *et al.*, 1997b). Las células de la teca producen IGF-BP2 mientras que las células de la granulosa producen IGF-BP4 (Armstrong *et al.*, 1998). La producción de IGF-BP está regulada por gonadotropinas *in vitro* (Armstrong *et al.*, 1998) y por factores nutricionales *in vivo*. Entonces la acción de los IGF en el ovario depende tanto de la cantidad de IGF como de la producción de IGF-BP que regulan la acción y biodisponibilidad de IGF a las células de la teca y granulosa dentro del folículo.

Con base en esos trabajos iniciales se estudió si una respuesta superovulatoria incrementada se podría lograr en animales tratados con somatotropina. En un estudio con vacas Holstein se determinó que el pretratamiento con somatotropina seguido de PMSG aumentó el número de embriones producidos (3.8 ± 1.1 en el lote tratado y 1.9 ± 0.7 en el testigo; Herrel *et al.*, 1990). Por el contrario, otro estudio también en animales lecheros señaló que no hubo incremento en el número de embriones transferibles con el pretratamiento de somatotropina además de FSH (5.2 ± 4.5 en el lote control y 5.3 ± 4.0 en el tratado; Rieger

et al., 1991). La diferencia entre estos dos tratamientos pudo ser el tiempo de aplicación de la somatotropina. Debido a lo anterior, se diseñó otro experimento en vaquillas aplicando la somatotropina 5 días antes del tratamiento superovulatorio con PMSG obteniendo un aumento en el número de folículos mayores a 5 mm, número de ovulaciones y número de embriones en el lote pretratado (Gong *et al.*, 1993). Durante tres experimentos consecutivos realizados por el mismo grupo de autores se utilizó FSH en lugar de PMSG para lograr la superovulación y se obtuvo un incremento de la tasa de ovulación, número de ovocitos y número total de embriones transferibles (Gong *et al.*, 1993).

Buratini *et al.*, (1999), trabajaron con vacas Nelore (*Bos indicus*) y encontraron un efecto significativo de la somatotropina mas la aspiración del folículo dominante sobre el número de folículos pequeños al compararlo con el lote testigo (63.4 vs 51.9; $p < 0.05$) demostrando que el aumento en los niveles circulantes de IGF's inducido por la aplicación de somatotropina aumenta la cantidad de folículos pequeños, los cuales podrán ser reclutados para proseguir su crecimiento hasta lograr su ovulación bajo protocolos superovulatorios. De igual forma, en un trabajo realizado por Carter *et al.*, (1998), suministraron 500 mg de somatotropina bovina a vacas Nelore ciclando y no ciclando en la época seca y encontraron diferencia significativa ($p < 0.05$) en la cantidad de folículos pequeños (2 – 5 mm) a favor del grupo tratado en ambas categorías.

2.3 ESTACIONALIDAD DE LOS CEBUINOS

Los animales *Bos indicus* poseen un patrón de ondas foliculares similares a las de los animales *Bos taurus*, en donde las hembras presentan 2 ó 3 ondas definidas en cada período con patrones de crecimiento folicular igualmente similares (Lucy *et al.*, 1992; Bo *et al.*, 1996). Aunque si existe diferencia en cuanto al número de folículos reclutables, las razas cebuínas presentan un número menor frente a razas europeas (Figueiredo *et al.*, 1997) razón

por la cual se deben realizar mayores estudios sobre la dinámica folicular en animales cebuínos.

Tradicionalmente, los técnicos que trabajan en zonas tropicales han evitado la superovulación de animales durante la época seca ya que la respuesta es impredecible, Información proveniente de estudios de campo no publicados (Avila, comunicación personal) indica que la respuesta superovulatoria durante esta época genera un menor número de embriones transferibles. Este concepto se apoya en algunas investigaciones que indican un efecto estacional en la fertilidad, dada probablemente por una pobre nutrición (Randel, 1984; Galina y Arthur, 1990). Sin embargo, las vacas seleccionadas como donadoras son generalmente suplementadas antes de los tratamientos, disminuyendo la posibilidad de fracaso debida a una pobre nutrición. Por otra parte existen efectos estacionales que afectan el desarrollo folicular en ganado *Bos indicus* tal como lo reportan Bastidas y Randel, (1987) quienes en un total de 1841 colecciones provenientes de 813 donadoras Brahman, encontraron un máximo de embriones por lavado durante el otoño (4.2) y un mínimo durante el invierno (2.9). Barros *et al.*, (1995), reportaron la existencia de un efecto estacional en la dinámica folicular de vacas en condiciones tropicales, demostrado por un aumento en el número de folículos de diversos tamaños en la época de lluvias. Por el contrario Zeitoun *et al.*, (1996) trabajaron con 60 vacas Brahman en dos temporadas del año y no encontraron diferencias significativas en cuanto a dinámica folicular pero si en cuanto a concentraciones de progesterona ($P < 0.01$) e indican que este puede ser una de las causas para que las hembras cebuínas presenten tasas de preñez mayores en los meses de mayo, junio y julio; por el contrario Rubio *et al.*, (1989) en vacas cebú Indobrasil no encontraron diferencias estadísticas en cuanto a la concentración de progesterona a lo largo del año, tampoco encontraron diferencias en cuanto al porcentaje de vacas en estro, fluctuando entre 45 y 60 %, aunque si reportaron diferencias notables en los porcentajes de fertilidad, siendo mayor en los meses de lluvias (60%) frente a un 8 % en la época de secas.

Una forma de probar la hipótesis de la estacionalidad en la dinámica folicular sería desafiar las vacas con tratamientos superovulatorios durante la época seca y la época de lluvias para determinar si los folículos que crecen tienen capacidad fertilizadora. Asimismo, determinar si es necesario condensar los tratamientos superovulatorios a la época de lluvias. Para desafiar el sistema se puede aumentar la diferencia natural existente entre las dos épocas suplementando de forma estratégica durante la época de lluvias y de esta forma determinar si existe diferencia en la respuesta entre ambas épocas. De esta forma, si la superovulación puede dar resultados satisfactorios en la época seca a pesar de no contar con una suplementación alimenticia, los técnicos tendrán una alternativa útil para continuar con las intervenciones reproductivas en los ranchos durante todo el año.

2.4 CLASIFICACION DE EMBRIONES

Después de completarse la singamia, se inicia la partición del óvulo fecundado, las divisiones son sincrónicas los primeros días y al avanzar en el desarrollo se pierde esta característica. Cuando se realiza la clasificación de embriones lo que se pretende es evaluar su calidad. Se clasifican con base en sus características morfológicas que lógicamente es una manera subjetiva y dependerá muchas veces de la experiencia del operador. No hay duda que la viabilidad de los embriones solo se puede evaluar eficazmente al tener en cuenta la tasa de preñez después de ser transferidos. De acuerdo a los criterios de Lindner and Wright, 1983, los embriones se clasifican en:

Estadio de **mórula temprana** se refiere a una agrupación o masa de células que tienden a ser esféricas, en la cual se pueden observar individualmente los blastómeros, la cuenta celular es difícil. La masa celular ocupa el 90 a 100 % del espacio perivitelino.

La mórula joven tiene como característica principal una agrupación mayor de células, aproximadamente el 80 % del espacio perivitelino. En este punto es imposible contar con exactitud el número de blastómeros.

La mórula compacta es aquella en la que la masa celular ocupa casi el 60 % del espacio perivitelino y los blastómeros ya tienen una forma poligonal. En la periferia de la masa celular las células son esféricas.

El blastocisto temprano es un embrión en fase de mórula compacta en la que se empieza a formar una cavidad interna ocupada por un fluido conocido como "blastocele". El blastocisto tiene una apariencia de anillo y ocupa del 70 a 80 % del espacio perivitelino. Se aprecia una diferencia visual entre el trofoblasto y la masa celular.

El blastocisto compacto se caracteriza por una pronunciada diferenciación entre las células del trofoblasto (que se extiende y alarga en toda la periferia del embrión) y el disco embrionario que es una masa muy pequeña de color muy oscuro y mas compacta. El blastocele abarca mas del 50 % del embrión y el embrión ocupa el 90 % del espacio perivitelino.

El blastocisto expandido es un estadio en el cual hay un apreciable aumento del diámetro del embrión y adelgazamiento de la zona pelúcida (hasta un tercio de su grosor normal) que ocupa el 100 % del espacio perivitelino.

El blastocisto en eclosión es aquel que tiene la zona pelúcida fisurada por donde eclosiona paulatinamente hasta salir totalmente de ella. El embrión puede tener la forma esférica de un blastocisto expandido o bien estar colapsado. Esta secuencia de desarrollo se presenta en forma cronológica en el cuadro 1.

El diámetro medio de un embrión bovino está calculado entre 150 a 190 micras incluyendo la zona pelúcida la cual mide unas 12 a 15 micras. El diámetro total del embrión permanece constante desde su formación hasta que se expande y eclosiona de su zona pelúcida (9no día aproximadamente; Lindner and Wright, 1983).

CUADRO 1

DESARROLLO EMBRIONARIO BOVINO

(Según Lindner and Wright, 1983)

TIEMPO	NUMERO DE CELULAS
36-48 horas de iniciado el estro	2 células
Día 3	4 a 8 células
Día 4	8 a 16 células
Día 4 a 5	Mórula temprana (mayor a 16 células)
Día 5 a 6	Mórula joven (32 a 64 células)
Día 6 a 7	Mórula compacta o Blastocisto temprano (160 células)
Día 7 a 8	Blastocisto compacto o expandido (aprox. 200 células)
Día 8 a 9	Blastocisto en eclosión (mayor de 200 células)

De acuerdo a la calidad (subjetiva) de las estructuras encontradas, los embriones se clasifican en (Lindner and Wright, 1983):

- **EXCELENTE:** Este es el embrión ideal. Esférico, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniformes.
- **BUENO:** Pequeñas imperfecciones como algunos blastómeros sueltos, tamaño irregular o algunas vesículas.

- **REGULAR:** Problemas definidos como la presencia de blastómeros sueltos, vesiculaciones o algunas células degeneradas.
- **MALO:** Problemas severos. Numerosos blastómeros sueltos, células degeneradas, células de distinto tamaño y/o numerosas vesículas.
- **DEGENERADO:** Los blastómeros están desorganizados y sueltos. Células de apariencia vesicular, granular o crecimiento retardado en relación con el resto de los embriones obtenidos.
- **NO FERTILIZADOS:** Estos pueden ser confundidos con mórulas compactas. Su apariencia es granular (puntillado), rodeado por una membrana vitelina lisa o en el caso de que esta esté rota, el puntillado cubrirá completamente el espacio vitelino.

CUADRO 2

Guía para la clasificación de embriones bovinos recomendada por La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).

De acuerdo a su calidad.

NUMERO	CALIDAD
1	Excelentes o buenos
2	Regulares
3	Malos
4	Muertos o degenerados

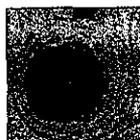
De acuerdo a su estado de desarrollo. (Continuación del cuadro 2)

NUMERO	ETAPA
1	No fertilizado
2	2 a 12 células
3	Mórula temprana
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto en eclosión
9	Blastocisto en eclosión y expansión

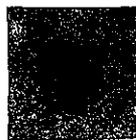
Los embriones de calidad 1 son los mejores para ser congelados, los de calidad 2 pueden ser congelados con pobres resultados pero aceptables para ser transferidos en fresco. Los de calidad 3 tienen índices de preñez malos y raras veces se transfieren (Avila, comunicación personal).

La figura 2 ejemplifica el desarrollo embrionario bovino con diferentes grados de calidad y estado, al igual que algunos comentarios sobre cada uno de los embriones presentados.

FIGURA 2. EJEMPLO DEL DESARROLLO Y CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS



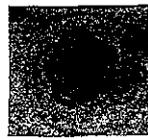
Edad: 6 días
Estado: 3
Calidad: 1
Comentarios:
a



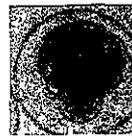
Edad: 6.5 días
Estado: 3
Calidad: 1
Comentarios:
a



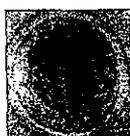
Edad: 6.5 días
Estado: 3
Calidad: 2
Comentarios:
a, b



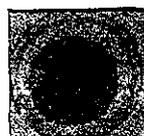
Edad: 6.5 días
Estado: 3
Calidad: 2
Comentarios:
a, b



Edad: 6.5 días
Estado: 4
Calidad: 1
Comentarios:
b, c, d



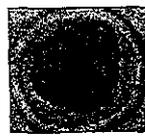
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 1
Comentarios:



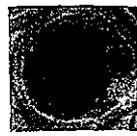
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 1
Comentarios:



Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 1
Comentarios:
d



Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 1
Comentarios:
d



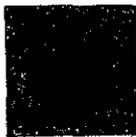
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 1
Comentarios:
d



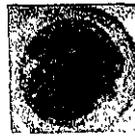
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 2
Comentarios:
b



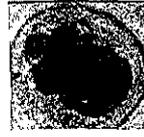
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 2
Comentarios:
b



Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 2
Comentarios:
b



Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 1
Comentarios:
b, e

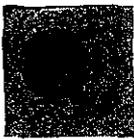


Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 2
Comentarios:
b

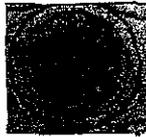
Comentarios:

- a: Si el embrión se colectó el día 7 o más tarde, no concuerda con el estado de desarrollo esperado, por lo cual disminuye su calidad
- b: Más del 15 % de las células se encuentran extruidas posiblemente desde un estado muy temprano
- c: Existen grandes blastómeros que indican que la compactación no se ha terminado
- d: Existe uno o pequeños blastómeros que comprometen menos del 15 % de la masa total del embrión y este concuerda con el estado de desarrollo esperado
- e: Espermatozoide en zona pelúcida

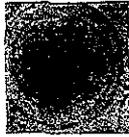
FIGURA 2. EJEMPLO DEL DESARROLLO Y CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS (cont)



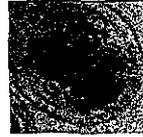
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 2
Comentarios:



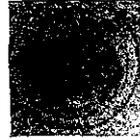
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 3
Comentarios:
f, g



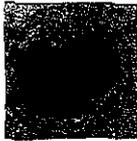
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 3
Comentarios:
f, g



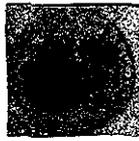
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 3
Comentarios:
f, g



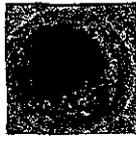
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 3
Comentarios:
f, g



Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 3
Comentarios:
f, g



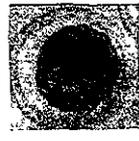
Edad: 7 días
Estado: 4
Calidad: 3
Comentarios:
f, g, h



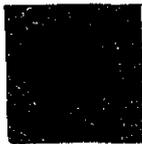
Edad: 7 días
Estado: 5
Calidad: 1
Comentarios



Edad: 7 días
Estado: 5
Calidad: 1
Comentarios:
d



Edad: 7 días
Estado: 5
Calidad: 1
Comentarios.



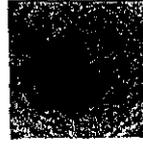
Edad: 7 días
Estado: 5
Calidad: 1
Comentarios:
d, i



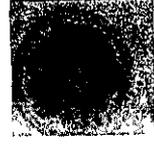
Edad: 7 días
Estado: 5
Calidad: 2
Comentarios:
e



Edad: 7 días
Estado: 5
Calidad: 2
Comentarios



Edad: 7 días
Estado: 5
Calidad: 2
Comentarios

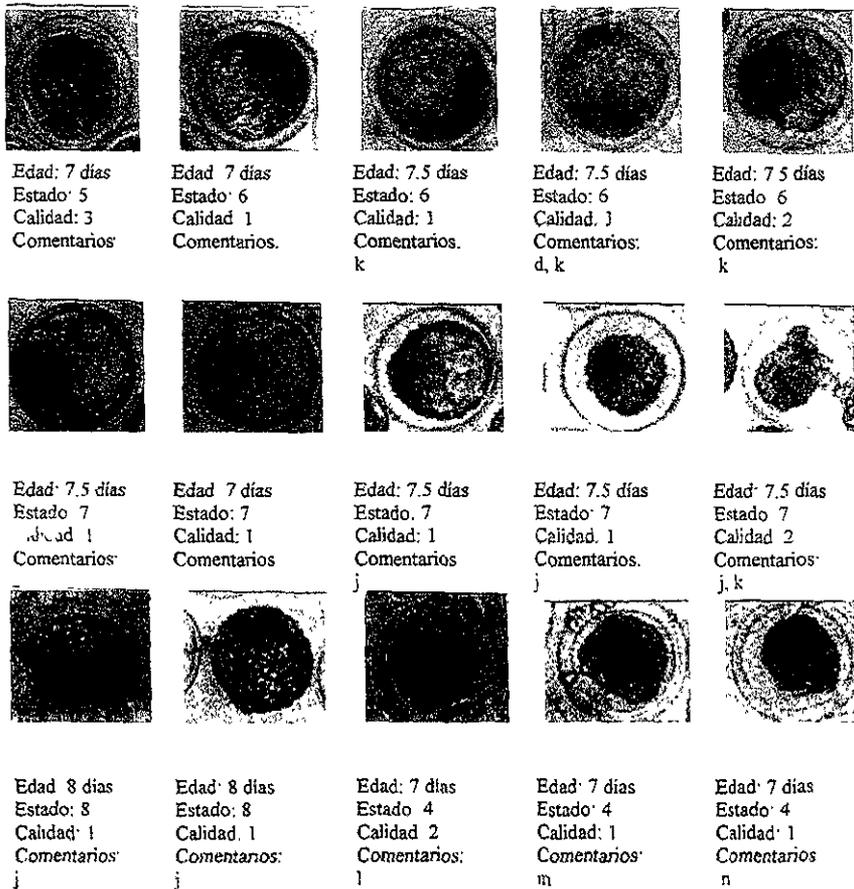


Edad: 7 días
Estado: 5
Calidad: 3
Comentarios:
g

Comentarios:

- d El blastómeros pequeños comprometen menos de 15 % de la masa celular embrionaria y el embrión está de acuerdo al estado de desarrollo esperado
- e Espermatozoide en zona pelúcida.
- f Embrión con muchas células extruidas que dificultan determinar la calidad y viabilidad del embrión
- g. Los embriones calidad 3 tiene una masa celular menor al 50 % del total de la masa interna incluyendo la zona pelúcida
- h. Este embrión tiene una masa celular muy pequeña. Si la masa es inferior al 25 % del total del material, se debe calificar con 4 de calidad. No viable
- i Un sombreado irregular es una variación común en el desarrollo del blastocoele

FIGURA 2. EJEMPLO DEL DESARROLLO Y CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS (cont)



Comentarios:

- d: Los blastómeros pequeños comprenden menos del 15 % del total de la masa celular y el desarrollo del embrión está de acuerdo a su estado
- j: El blastocelo colapsado se considera un proceso normal que no baja la calidad del embrión
- k: Existen células extruidas en los estados 6, 7 y 8 que están prensadas contra la zona pelúcida.
- l: La zona pelúcida del embrión está ligeramente aplanada. Este defecto por sí solo impide que el embrión se clasifique como calidad 1 y no debe ser utilizado en transacciones comerciales.
- m: Los restos celulares en la superficie de la zona pelúcida muestran que este embrión no fue lavado apropiadamente
- n: Este embrión tiene la zona pelúcida rota. Estos embriones no se deben usar en transacciones comerciales

3. HIPOTESIS

La adición de somatotropina bovina en los tratamientos de Folltropin-V mejora la respuesta superovulatoria y aumenta la cantidad de embriones transferibles en vacas *Bos indicus*. Este efecto es constante en la época seca y de lluvias.

4. OBJETIVO

Determinar el efecto de la combinación de Folltropin-V con somatotropina bovina en la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en hembras *Bos indicus* en dos épocas del año.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo se realizó en el Centro de Educación, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (C.E.I.E.G.T) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M). Este centro está ubicado en el municipio de Tlapacoyan, estado de Veracruz, México. Posee una temperatura media de 21.8°C con un máximo de 40°C y un mínimo de 13°C. Cuenta con un régimen pluvial de 1780 mm anuales, y su clima está clasificado como caliente, húmedo sin temporada seca definida (García, 1981).

3. HIPOTESIS

La adición de somatotropina bovina en los tratamientos de Folltropin-V mejora la respuesta superovulatoria y aumenta la cantidad de embriones transferibles en vacas *Bos indicus*. Este efecto es constante en la época seca y de lluvias.

4. OBJETIVO

Determinar el efecto de la combinación de Folltropin-V con somatotropina bovina en la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en hembras *Bos indicus* en dos épocas del año.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo se realizó en el Centro de Educación, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (C.E.I.E.G.T) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M). Este centro está ubicado en el municipio de Tlapacoyan, estado de Veracruz, México. Posee una temperatura media de 21.8°C con un máximo de 40°C y un mínimo de 13°C. Cuenta con un régimen pluvial de 1780 mm anuales, y su clima está clasificado como caliente, húmedo sin temporada seca definida (García, 1981).

3. HIPOTESIS

La adición de somatotropina bovina en los tratamientos de Folltropin-V mejora la respuesta superovulatoria y aumenta la cantidad de embriones transferibles en vacas *Bos indicus*. Este efecto es constante en la época seca y de lluvias.

4. OBJETIVO

Determinar el efecto de la combinación de Folltropin-V con somatotropina bovina en la respuesta superovulatoria y cantidad de embriones transferibles en hembras *Bos indicus* en dos épocas del año.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo se realizó en el Centro de Educación, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (C.E.I.E.G.T) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M). Este centro está ubicado en el municipio de Tlapacoyan, estado de Veracruz, México. Posee una temperatura media de 21.8°C con un máximo de 40°C y un mínimo de 13°C. Cuenta con un régimen pluvial de 1780 mm anuales, y su clima está clasificado como caliente, húmedo sin temporada seca definida (García, 1981).

A pesar de no existir una estación seca bien definida (García, 1981) se puede decir que las condiciones climáticas dividen al año en tres épocas: La época 1, conocida comúnmente como la época de nortes, la cual se caracteriza por baja temperatura ambiental y elevada humedad relativa; este período comprende los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero; la época 2, denominada la época de secas, se diferencia por alta temperatura ambiente y baja precipitación pluvial, y comprende a los meses de marzo, abril, mayo y junio; la época 3 o época de lluvias, ésta se caracteriza por alta temperatura ambiental y elevada precipitación pluvial, esta época abarca los meses de julio, agosto, septiembre y octubre.

5.2 UNIDADES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 22 hembras Brahman entre 3 y 6 años de edad con peso promedio de 450 kg y que no se encontraban en la etapa de lactancia. Poseían una condición corporal aceptable (2.5 a 4) dentro de la calificación que va del 1 al 5 para ganado de tipo *Bos indicus* (Pullan, 1978).

Solo fueron parte del trabajo las vacas que presentaron cuerpo lúteo el día de iniciada la superovulación. Las vacas estaban libres de alteraciones anatómicas o fisiológicas que pudieran afectar su fertilidad.

Las hembras fueron mantenidas bajo las condiciones de manejo utilizadas en dicho centro, el cual posee un sistema de pastoreo de alta densidad, en donde predominan el pasto Estrella (*Cynodon nemfluencis*) y los pastos nativos.

5.3 METODOLOGÍA

El trabajo se realizó en dos etapas; la primera en abril-mayo (época de secas) y la segunda en julio-agosto (época de lluvias). Se realizó un seguimiento ultrasonográfico (Aloka 500 con transductor lineal de 7.5 Mhz) y se tomaron muestras de sangre cada tercer día iniciando en el mes de abril y hasta finalizar el trabajo. Las primeras para conocer la dinámica folicular y las segundas para determinar las concentraciones de progesterona que presentaron las vacas durante el trabajo. Los folículos se dividieron en clases 1, 2 y 3 para folículos menores a 4 mm, entre 4 y 8 mm y mayores de 8 mm respectivamente. De acuerdo a los niveles de progesterona, las vacas se clasificaron como anéstricas (aquellas cuyos niveles estaban por debajo de 1 ng/ml en 4 muestreos consecutivos) y ciclando.

En la época de secas, se sincronizaron todas las hembras mediante la aplicación de un implante de progestágeno (6 mg de Norgestomet) durante 9 días y un compuesto inyectable con 5 mg de valerato de estradiol y 3 mg de Norgestomet (Syncro mate B – Meriel-México). El día del retiro del implante se aplicó una inyección de 25 mg de prostaglandina F2 alfa (Lutalyse-Upjohn-México) para inducir la aparición del celo 2 días después aproximadamente (celo = día 0). Las vacas que presentaron celo (permitir la monta por otra hembra) se dividieron aleatoriamente en 2 grupos denominados lote tratado y lote testigo, para iniciar el proceso de superovulación. El lote testigo quedó formado por 9 vacas de las que se eliminaron 2 por no tener cuerpo lúteo (determinado por palpación y ultrasonografía) al momento de iniciada la superovulación, de esta forma el lote testigo quedó formado por 7 vacas; a estas se les aplicó hormona Foliculoestimulante, (Folltropin V-Litton-México), a una dosificación de 240 mg de NIH-FSH-P1, durante los días 9, 10, 11, 12 y 13; el día 12 se aplicaron 25 mg de prostaglandina F2 alfa. Durante los días 14 y 15 se hizo revisión de celos en forma continua, dando inseminación artificial a cada vaca 12 y 24 horas después de iniciado el celo. La secuencia cronológica utilizada durante la época de secas se presenta en el cuadro 3.

En el lote tratado respondieron a la sincronización 9 vacas pero una de estas no presentó cuerpo lúteo al momento de iniciada la superovulación, por lo cual este grupo quedó formado por 8 animales que recibieron el mismo protocolo usado en el lote testigo, además de la aplicación subcutánea de una dosis de Lactotropina (Complejo de somatotropina bovina Zinc - Monsanto) a la dosis de 500 mg el día 4 por vía subcutánea, lo que corresponde a 5 días antes del inicio del tratamiento de superovulación, de acuerdo a lo recomendado por Gong *et al.*, (1993) para vaquillas.

En la época de lluvias se suministró una suplementación alimenticia desde 30 días antes de iniciada la segunda superovulación, a base de un alimento concentrado que poseía 2.8 Mcal ED/kg y 14 % de PC (Consumo de 0.5 % del peso vivo/día). La suplementación en la época favorable del año tuvo la finalidad de incrementar la posible diferencia existente entre las dos épocas que se compararon, de esta forma se facilitó la comparación entre ellas. En esta época las vacas se cambiaron de tratamiento, para que las vacas que estuvieron como lote testigo en la época de secas recibieran el tratamiento y las vacas del grupo de tratamiento sirvieran como grupo testigo. De esta forma se inició la sincronización de 22 hembras de las cuales 18 demostraron signos de celo. Los grupos de tratamiento y control quedaron formados por 9 vacas cada uno.

En ambas épocas se realizó la recolección embrionaria 6.5 días después de la primera inseminación y los embriones obtenidos fueron evaluados inmediatamente por visualización al microscopio estereoscópico para determinar el estado de desarrollo y calidad. Este mismo día se determinó la respuesta ovárica al tratamiento realizando el conteo de cuerpos lúteos por palpación rectal y confirmados por ultrasonografía. En ese momento se aplicaron 25 mg de prostaglandina (Lutalyse-Upjohn) repitiéndose 13 días después. La secuencia cronológica utilizada para la época de lluvias se presenta en el cuadro 4. De acuerdo a lo descrito por Bastidas y Randal, (1984) se evaluó la calidad de la respuesta superovulatoria en buena (> 10 cuerpos lúteos), pobre (< 9 cuerpos lúteos): La

cantidad de estructuras recuperadas (embriones/óvulos) en buena (> 6 estructuras) y pobre (< 5 estructuras) y cantidad de embriones transferibles en buena (> 3 embriones transferibles), pobre (< 3 embriones transferibles) y sin respuesta.

Los embriones se clasificaron de acuerdo a lo descrito por Lindner, (1983) en óvulos no fecundados, mórula inmadura, mórula joven, mórula compacta, blastocisto inmaduro, blastocisto maduro, blastocisto expandido y blastocisto en eclosión como se muestra en el cuadro 2. De acuerdo a la calidad embrionaria se clasificaron en excelente, bueno, regular y malo cuadro ;2 (Shea, 1981).

Los embriones clasificados como transferibles (excelentes y buenos) se congelaron por el método de un solo paso descrito por Leibo (1981).

6. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos fueron analizados a través de estadística no paramétrica utilizando la prueba de Wilcoxon, usando el paquete estadístico SAS. Se usó como variables independientes la adición de somatotropina y la época del año. Como variable de respuesta el número de folículos, número de cuerpos lúteos producidos, el número de estructuras recuperadas (embriones/óvulos) y el número de embriones transferibles. También se utilizó la correlación de Spearman para determinar la relación entre folículos pequeños (clase I) al inicio de la superovulación con la respuesta superovulatoria. Los resultados obtenidos se consideraron significativos con $p < 0.05$.

cantidad de estructuras recuperadas (embriones/óvulos) en buena (> 6 estructuras) y pobre (< 5 estructuras) y cantidad de embriones transferibles en buena (> 3 embriones transferibles), pobre (< 3 embriones transferibles) y sin respuesta.

Los embriones se clasificaron de acuerdo a lo descrito por Lindner, (1983) en óvulos no fecundados, mórula inmadura, mórula joven, mórula compacta, blastocisto inmaduro, blastocisto maduro, blastocisto expandido y blastocisto en eclosión como se muestra en el cuadro 2. De acuerdo a la calidad embrionaria se clasificaron en excelente, bueno, regular y malo cuadro ;2 (Shea, 1981).

Los embriones clasificados como transferibles (excelentes y buenos) se congelaron por el método de un solo paso descrito por Leibo (1981).

6. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos fueron analizados a través de estadística no paramétrica utilizando la prueba de Wilcoxon, usando el paquete estadístico SAS. Se usó como variables independientes la adición de somatotropina y la época del año. Como variable de respuesta el número de folículos, número de cuerpos lúteos producidos, el número de estructuras recuperadas (embriones/óvulos) y el número de embriones transferibles. También se utilizó la correlación de Spearman para determinar la relación entre folículos pequeños (clase 1) al inicio de la superovulación con la respuesta superovulatoria. Los resultados obtenidos se consideraron significativos con $p < 0.05$.

CUADRO 3

ESQUEMA DEL PROGRAMA SUPEROVULATORIO EN LOS TRATAMIENTOS

(Epoca de secas)

FECHA	DIA	LOTE TESTIGO	LOTE DE TRATAMIENTO
05-04-99	(0)	Implante 6 mg de norgestomet. Inyección de 5 mg de valerato de estradiol y 3 mg de norgestomet ¹	Implante 6 mg de norgestomet. Inyección de 5 mg de valerato de estradiol y 3 mg de norgestomet. ¹
14-04-99	(9)	Retiro del implante. 25 mg de Prostaglandina F2alfa ²	Retiro del implante. 25 mg de Prostaglandina F2alfa ²
15-04-99	(10)	Vacas en celo sincronizado.	Vacas en celo sincronizado.
16-04-99	(11)	Vacas en celo sincronizado.	Vacas en celo sincronizado.
20-04-99	4		Somatotropina. 500 mg ³ .
25-04-99	9	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM
26-04-99	10	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM
27-04-99	11	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM
28-04-99	12	1.0 ml Folltropin ⁴ AM/PM 25 mg de Prostaglandina F2 alfa ²	1.0 ml Folltropin ⁴ AM/PM 25 mg de Prostaglandina F2 alfa ²
29-04-99	13	1.0 ml Folltropin ⁴ AM	1.0 ml Folltropin ⁴ AM
30-04-99	14	Vacas en celo. Inseminación 12 y 24 horas después de iniciado el celo.	Vacas en celo. Inseminación 12 y 24 horas después de iniciado el celo.
01-05-99	15	Vacas en celo. Inseminación 12 y 24 horas después de iniciado el celo.	Vacas en celo. Inseminación 12 y 24 horas después de iniciado el celo.
07-05-99	21	Recolección embrionaria.	Recolección embrionaria.
08-05-99	22	Recolección embrionaria	Recolección embrionaria.

1. Syncro-mate-B (Meriel-México)
2. Lutalyse (Upjohn-México)
3. Complejo de Somatotropina Bovina-Zinc (Monsanto-México).
4. Folltropin-V (Litton-México)

CUADRO 4

ESQUEMA DEL PROGRAMA SUPEROVULATORIO EN LOS TRATAMIENTOS

(Epoca de lluvias)

FECHA	DÍA	LOTE TESTIGO	LOTE DE TRATAMIENTO
14 - 06 - 99	(0)	Implante 6 mg de norgestomet Inyección de 5mg.de valerato de estradiol y 3 mg de norgestomet ¹	Implante 6 mg de norgestomet. Inyección de 5 mg. de valerato de estradiol y 3 mg de norgestomet ¹
23 - 06 - 99	(9)	Retiro del implante.25 mg de Prostaglandina F2alfa ²	Retiro del implante.25 mg de Prostaglandina F2alfa ²
24 - 06 - 99	(10)	Vacas en celo sincronizado.	Vacas en celo sincronizado.
25 - 06 - 99	(11)	Vacas en celo sincronizado.	Vacas en celo sincronizado.
29 - 06 - 99	4		Somatotropina. 500 mg. ³
4 - 07 - 99	9	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM	1.5ml Folltropin ⁴ AM/PM
5 - 07 - 99	10	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM	1.5ml Folltropin ⁴ AM/PM
6 - 07 - 99	11	1.5 ml Folltropin ⁴ AM/PM	1.5ml Folltropin ⁴ AM/PM
7 - 07 - 99	12	1.0 ml Folltropin ⁴ AM/PM 25 mg de Prostaglandina F2 alfa ²	1.0ml Folltropin ⁴ AM/PM 25 mg de Prostaglandina F2 alfa ²
8 - 07 - 99	13	1.0 ml Folltropin ⁴ AM	1.0 ml Folltropin ⁴ AM
9 - 07 - 99	14	Vacas en celo. Inseminación 12 y 24 horas después de iniciado el celo.	Vacas en celo. Inseminación 12 y 24 horas después de iniciado el celo.
10 - 07 - 99	15	Vacas en celo. Inseminación 12 y 24 horas después de iniciado el celo.	Vacas en celo. Inseminación 12 y 24 horas después de iniciado el celo.
16 - 07 - 99	21	Recolección embrionaria.	Recolección embrionaria.
17 - 07 - 99	22	Recolección embrionaria.	Recolección embrionaria..

1. Syncro-mate-B (Meriel-México)
2. Lutalyse (Upjohn-México)
3. Complejo de SomatotropinaBovina-Zinc (Monsanto-México).
4. Folltropin-V (Litton-México)

7. RESULTADOS

7.1 DINAMICA FOLICULAR

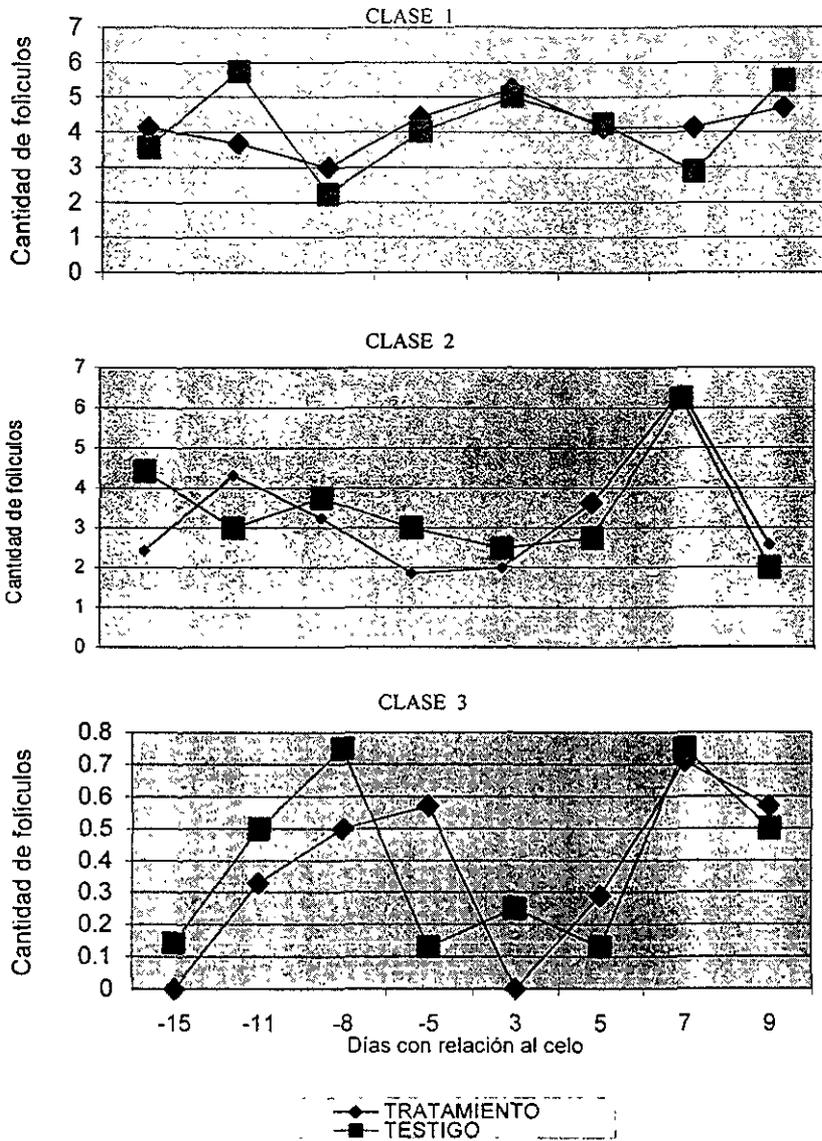
La dinámica folicular durante la época de secas no mostró diferencias significativas entre las tres clases de folículos, aunque después de la aplicación de somatotropina se observó la tendencia hacia un mayor número de folículos clase 1 (< 4 mm) en el lote tratado comparado con el lote testigo ($p=0.55$) como se observa en la figura 3.

En la época de lluvias tampoco existieron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los dos tratamientos en cuanto a clase 1, 2 y 3 de folículos (figura 4).

En la época de secas la población folicular de clase 1 al momento de iniciada la superovulación en ambos grupos no se relacionó con la respuesta superovulatoria medida por la cantidad de cuerpos lúteos 7 días después del celo ($r=0.205$, $p=0.42$). En ésta época, el total de folículos clase 1 al inicio de la superovulación fue de 29 y 30 para el lote tratado y lote testigo respectivamente; mientras que la cantidad de cuerpos lúteos fue de 73 y 53 para el lote tratado y testigo respectivamente.

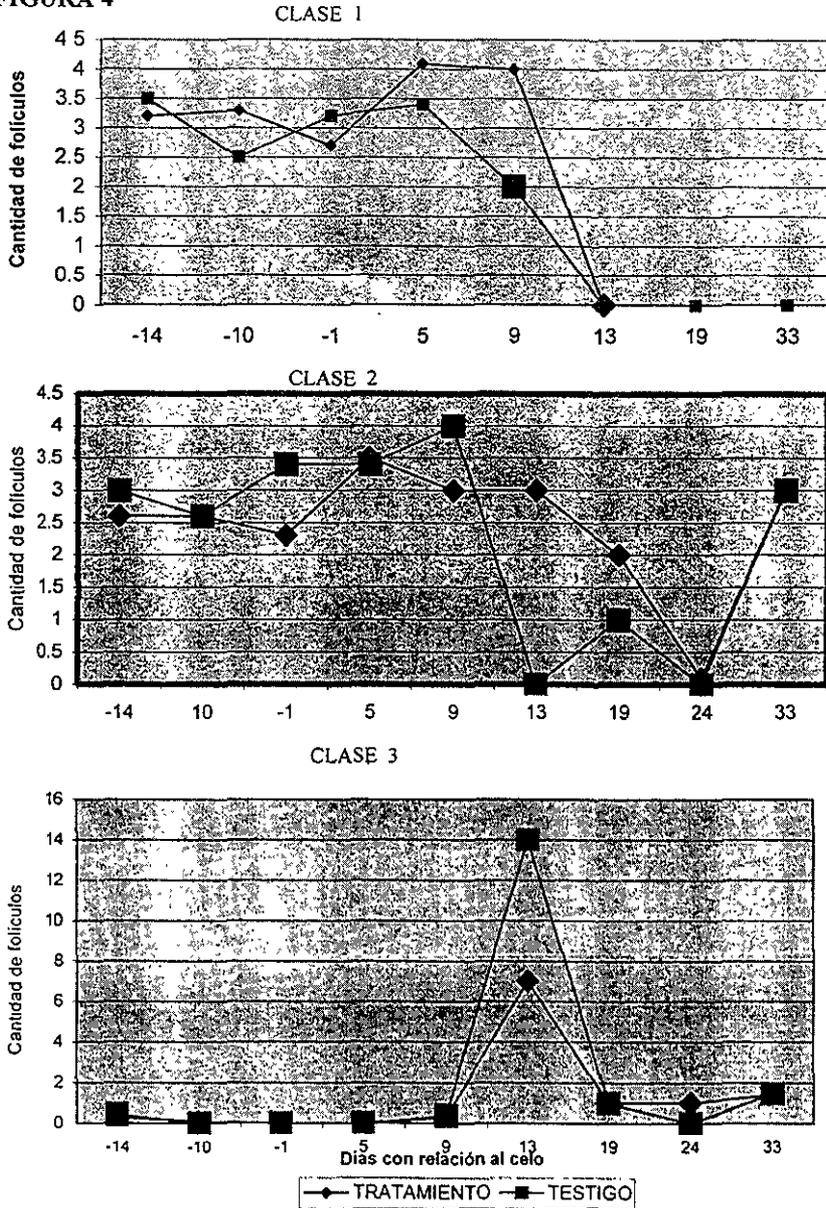
En la época de lluvias, la cantidad de folículos clase 1 al iniciar la aplicación de Folltropin fue de 30 para el lote tratado y de 15 para el testigo mientras que el total de cuerpos lúteos en ambos grupos fue de 93 y 96 respectivamente. En ésta época tampoco hubo relación significativa entre las dos variables ($r=0.13$, $p=0.58$).

FIGURA 3



MEDIA DE FOLICULOS (clase 1, 2 y 3) EN EL LOTE DE TRATAMIENTO CON SOMATOTROPINA Y EL LOTE TESTIGO EN LA EPOCA DE SECAS

FIGURA 4



MEDIA DE FOLICULOS (clase 1, 2 y 3) EN EL LOTE DE TRATAMIENTO CON SOMATOTROPINA Y EL LOTE TESTIGO EN LA EPOCA DE LLUVIAS

7.2 RESPUESTA A LA SINCRONIZACION

En la época de secas, el 38 % de las hembras se encontraban ciclando mientras que el 62 % se encontraban en anestro antes de recibir el protocolo superovulatorio. En esta época respondieron 18 vacas a la sincronización evaluados por la respuesta de celo, lo que corresponde a 81 %. Los signos de celo (permitir monta por otra hembra) iniciaron en promedio 40 ± 5 horas después del retiro del implante y aplicación de prostaglandina. Estas vacas se distribuyeron al azar en el lote de tratamiento y en el testigo para recibir el respectivo protocolo superovulatorio. De esta forma se asignaron 9 vacas al lote de tratamiento sin embargo 2 de estas no presentaron cuerpo lúteo el día de inicio de la aplicación de Folltropin-V por lo cual salieron del experimento quedando solo 7 vacas en esta época. El lote testigo quedó formado por 8 vacas ya que en el momento de iniciar el proceso superovulatorio, una vaca no presentó cuerpo lúteo quedando solamente 7 vacas para este grupo. Durante el proceso de superovulación, la respuesta al celo en ambas fases ocurrió 25 ± 4 horas después de la aplicación de prostaglandina sin presentarse diferencias estadísticas entre los dos grupos ($p > 0.05$).

En la época de lluvias, los animales recibieron los tratamientos sincronizadores y superovulatorios tal como se indicó en materiales y métodos. En esta época se encontraban el 82 % de las vacas ciclando y el 18 % en anestro (figura 5). Sin embargo, respondieron a la sincronización el total de los animales por lo cual se distribuyeron en sus tratamientos respectivos; las que en la época de secas recibieron el tratamiento, ahora formaron el lote testigo y viceversa. Los signos de celo aparecieron en promedio 42 ± 4 horas después del retiro del implante y aplicación de prostaglandina. Al iniciar la aplicación de Folltropin-V, cuatro animales no presentaron cuerpo lúteo a la palpación y ultrasonografía (2 del lote con tratamiento y 2 del lote testigo) por lo cual fueron excluidas del trabajo. De esta forma quedaron formados el lote de tratamiento y el testigo con 9 animales cada uno. Durante el

proceso de superovulación en esta época, la respuesta al celo en ambas fases ocurrió 27 ± 5 horas después de la aplicación de prostaglandinas sin presentarse diferencias estadísticas entre ambos grupos ($p > 0.05$).

7.3 RESPUESTA SUPEROVULATORIA

En la época de secas, el lote que recibió el tratamiento ($n=7$) presentó 73 cuerpos lúteos (media: 10.4) mientras que el lote testigo ($n=8$) presentó 53 (media: 6.6). En esta variable no hubo diferencias significativas ($p=0.062$). En la época de lluvias, el lote tratado ($n=9$) presentó 93 cuerpos lúteos (media: 10.3) mientras que el lote testigo ($n=9$) presentó 96 (media: 10.6); esta variable no presentó diferencias significativas ($p=0.721$). De igual forma tampoco se encontraron diferencias significativas en la respuesta entre las vacas que estaban ciclando o en anestro antes de empezar el tratamiento superovulatorio en ambas épocas ($p > 0.05$).

De la misma forma, no existieron diferencias estadísticas entre las vacas que recibieron el tratamiento en las fases 1 y 2 ($p=0.957$). Por el contrario, si hubo diferencias significativas entre los lotes testigo en ambas épocas ($p=0.022$) (Cuadro 5). También existieron diferencias significativas al comparar la respuesta en el lote testigo en la época de secas con el tratamiento en la época de lluvias ($p=0.03$).

CUADRO 5

RESPUESTA SUPEROVULATORIA DEL LOTE TRATADO Y TESTIGO EN AMBAS FASES DE ACUERDO A LA CANTIDAD DE CUERPO LUTEOS

MEDIA DE CUERPOS LUTEOS			
	EPOCA SECA	EPOCA LLUVIAS	TOTAL
TRATAMIENTO	73 (X:10.4;n=7) ^{ab}	93 (X: 10.3; n=9) ^a	166
TESTIGO	53 (X: 6.6; n=8) ^b	96 (X: 10.6;n=9) ^a	149
TOTAL	126	189	315

Literales distintas indican que existe diferencia estadística ($p < 0.05$)

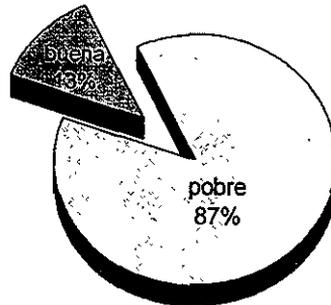
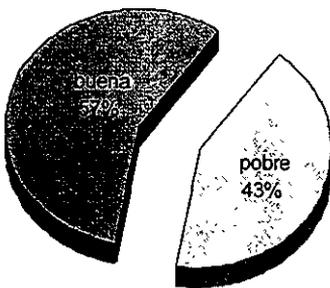
De acuerdo a la calidad de la respuesta, se clasificaron como buena en la época de secas 4 vacas del lote de tratamiento y 1 del lote testigo mientras que con pobre respuesta 3 del lote de tratamiento y 7 del testigo. Al comparar los animales que estuvieron en el mismo grupo, se encontró que de los 7 animales que recibieron somatotropina, el 57 % de ellos presentaron una respuesta que se clasificó como buena mientras que el 43 % como pobre. De igual manera, en el lote testigo el 13 % de las respuestas fueron buenas mientras que el 87 % fueron malas (figura 5).

FIGURA 5

EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ACUERDO A CONTEO DE CUERPOS LUTEOS EN LA EPOCA DE SECAS

LOTE DE TRATAMIENTO

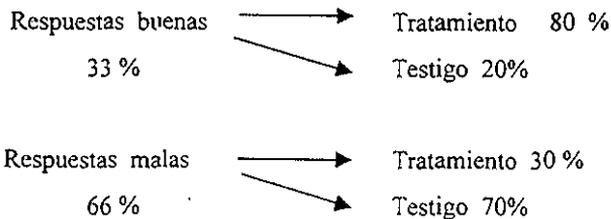
LOTE TESTIGO



Buena: > 10 cuerpos lúteos

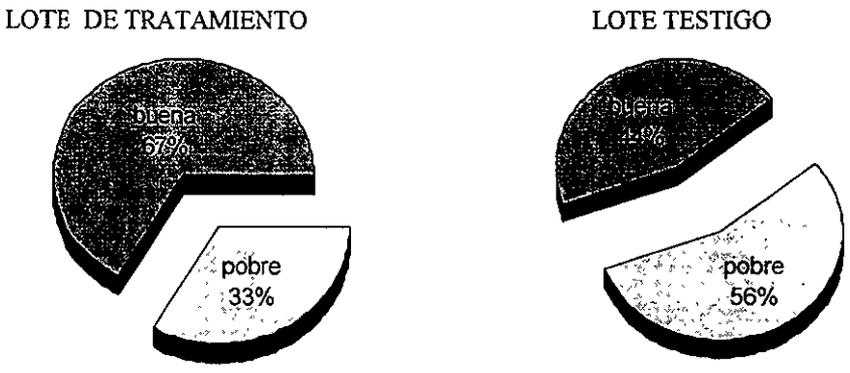
Pobre: < 10 cuerpos lúteos.

Al determinar la calidad de las respuestas en esta época, la mayoría de las buenas respuestas provienen de animales que recibieron el tratamiento de somatotropina, de igual forma, dentro de los animales con mala respuesta, la mayoría de estas pertenecen a animales del lote testigo tal como se aprecia en el siguiente flujograma.



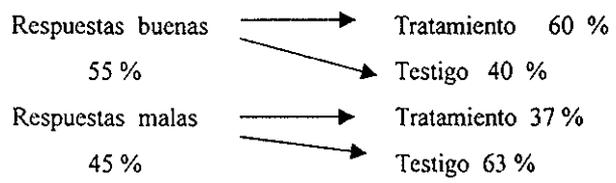
En la época de lluvias hubo 6 vacas con buena respuesta en el lote de tratamiento y 4 del testigo mientras que con mala respuesta 3 y 5 vacas del lote de tratamiento y testigo respectivamente. Al comparar los animales que estuvieron en el mismo grupo, las respuestas se distribuyeron como se muestra en el figura 6.

FIGURA 6
EVALUACION DE LA RESPUESTA EN EL LOTE TRATADO Y TESTIGO DE ACUERDO A CONTEO DE CUERPO LUTEOS EN LA EPOCA DE LLUVIAS



Buena: > 10 cuerpos lúteos
 Pobre: < 10 cuerpos lúteos

Al determinar la calidad de las respuestas en esta época, al igual que en época de secas, la mayoría de las buenas respuestas provienen de animales que recibieron el tratamiento. de igual forma que dentro de los animales con mala respuesta, la mayoría de estas pertenecen a animales del lote testigo tal como se aprecia en el siguiente flujograma.



7.4 RECUPERACION DE ESTRUCTURAS Y EMBRIONES TRANSFERIBLES

En la época de secas la cantidad de estructuras (embriones/óvulos) fueron 23 (recuperación de 31 %) en el lote de tratamiento (media: 3.2; n=7) y 15 (recuperación de 46 %) en el lote testigo (media: 3; n=5), aunque no existieron diferencias significativas entre el tratamiento y el grupo testigo ($p=0.616$). Asimismo, no hubo diferencias significativas en el número de embriones transferibles ($p=0.699$) en donde el lote tratado produjo 9 (media: 1.28) mientras que el lote testigo 11 (media: 2.2), estos últimos fueron producidos por una sola vaca (ver cuadros 5 y 6). En la época de lluvias la cantidad de estructuras recuperadas (embriones/óvulos) fueron 39 (recuperación de 42 %) en el lote de tratamiento (media: 4.3; n=9) y 18 (recuperación de 18 %) en el lote testigo (media: 2; n=9; $p=0.059$). Se encontraron diferencias significativas ($p=0.017$) en el número de embriones transferibles en donde el lote de tratamiento produjo 26 mientras que el lote testigo 2 (media : 2.2 y 0.2 respectivamente; ver cuadros 6 y 7).

Al comparar las estructuras recuperadas en ambas épocas (Cuadro 6), no existieron diferencias estadísticas ($p=0.390$) entre los animales que recibieron el tratamiento. De igual forma no hubo diferencias significativas entre los lotes testigos en las dos épocas ($p=0.580$).

En las dos épocas del trabajo se produjeron 48 embriones transferibles (Cuadro 7), 35 de los cuales fueron obtenidos de animales que recibieron el tratamiento, (9 en la fase 1 y 26 en la fase 2; $p=0.219$). De igual forma se produjeron 13 embriones transferibles en los lotes testigo, de los cuales 11 provienen de la primera época y 2 de la segunda sin haber diferencias significativas ($p=0.661$).

CUADRO 6**CONTEO DE ESTRUCTURAS RECUPERADAS EN EL LOTE TRATADO Y TESTIGO EN AMBAS EPOCAS**

CONTEO DE EMBRIONES/ÓVULOS RECUPERADOS			
	EPOCA SECA	EPOCA LLUVIAS	TOTAL
TRATAMIENTO	23 (media: 3.2; n=7) ^a	39 (media: 4.3; n=9)	62
TESTIGO	15 (media: 3; n=5) ^a	18 (media: 2; n=9)	33
TOTAL	38	57	95

Literales distintas indican que existe diferencia estadística ($p < 0.05$)

CUADRO 7**CONTEO DE EMBRIONES TRANSFERIBLES EN EL LOTE TRATADO Y TESTIGO EN AMBAS FASES**

CONTEO DE EMBRIONES TRANSFERIBLES			
	EPOCA SECAS	EPOCA LLUVIAS	TOTAL
TRATAMIENTO	9 (media: 1.28; n=7) ^a b	26 (media: 2.8; n=9) ^a	35
TESTIGO	11 (media: 2.2; n=5) ^a b	2 (media: 0.2; n=9) ^b	13
TOTAL	20	28	48

Literales distintas indican que existe diferencia estadística ($p < 0.05$).

En la época se secas se realizaron 12 lavados uterinos de los que se recuperaron 38 estructuras (embriones/óvulos) en ambos grupos. Estas estructuras fueron recuperadas de 8 vacas ya que 4 animales (33 %) no presentaron embriones (2 vacas de tratamiento y 2 vacas del lote testigo). De acuerdo a las estructuras recuperadas, el 33 % de los lavados (4 lavados) se clasificaron como buenos mientras que el 33 % resultaron pobres, tal como se presenta en el cuadro 8.

CUADRO 8

EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ACUERDO A CONTEO DE EMBRIONES/ÓVULOS EN EL LOTE TRATADO Y TESTIGO EN LA EPOCA SECA

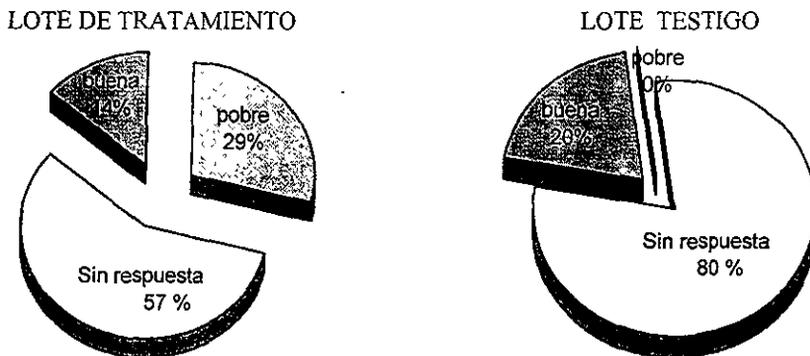
	CLASIFICACION DE VACAS DE ACUERDO AL TIPO DE RESPUESTA		
	BUENA	POBRE	SIN RESPUESTA
TRATAMIENTO (n=7)	3	2	2
TESTIGO (n=5)	1	2	2
TOTAL	4 (33 %)	4 (33 %)	4 (33 %)

Buena : superior a 6 estructuras (de acuerdo con Bastidas y Randel ,1984).

De todas las estructuras recuperadas en la época de secas, sólo 20 embriones se clasificaron como transferibles (lo que corresponde a 52 % del total de embriones). De los 12 lavados realizados, 8 (66 %) de ellos no produjeron ningún embrión transferible, por el contrario el 55 % de los embriones transferibles (11 embriones) fueron producidos por 1 vaca perteneciente al lote testigo. la calidad de la respuesta se clasificó como buena. superior a 3 embriones transferibles y pobre por debajo de este valor; los resultados se expresan en la figura 7.

FIGURA 7

EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ACUERDO A CONTEO DE EMBRIONES TRANSFERIBLES EN LA EPOCA DE SECAS



Buena: > 3 embriones
Pobre: < 3 embriones
Sin respuesta: 0 embriones

Teniendo en cuenta solo los lavados de animales que recibieron el tratamiento con somatotropina, el 66 % fueron buenos mientras que el 33 resultaron pobres. Por otro lado en el lote testigo los resultados buenos y pobres fue de 44 % y 55 % respectivamente.

En la época de lluvias se recuperaron 57 estructuras (embriones/óvulos) provenientes de 15 vacas ya que en 3 animales (16 %) no se recuperó ninguna estructura, mientras que el 28 % de los lavados fueron clasificados como de buena calidad (mas de 6 estructuras / lavado) de igual forma el 56 % se clasificaron como pobres.

En esta época se clasificaron 5 lavados como buenos de los cuales el 80 % (4 lavados) provenían de animales que recibieron el tratamiento mientras que el 20 % fueron del lote

testigo. Por otra parte, el lote que recibió el tratamiento presentó el 44 % de los lavados como buenos, el 44 % como pobres y 12 % sin respuesta; mientras que en el lote testigo los resultados fueron el 12, 66 y 22 % respectivamente, como se muestra en el cuadro 9.

CUADRO 9

EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ACUERDO A CONTEO DE EMBRIONES/ÓVULOS EN LA EPOCA DE LLUVIAS

	CANTIDAD DE VACAS CON RESPUESTA		
	BUENA	POBRE	SIN RESPUESTA
TRATAMIENTO (n=9)	4	4	1
TESTIGO (n=9)	1	5	2
TOTAL	5 (27 %)	10 (55 %)	3 (16 %)

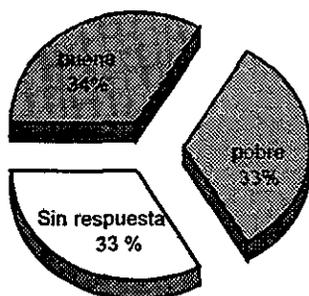
Buena : superior a 6 estructuras (de acuerdo con Bastidas y Randel, 1984)

De igual forma en lluvias se obtuvieron 28 embriones transferibles de los cuales el 92 % (26 embriones) provienen de vacas en el lote con tratamiento, siendo 7 el número mas alto de embriones transferibles por vaca. Asimismo el 61 % de los lavados no produjeron embriones transferibles. De estos, el 73 % corresponde a lavados en el lote testigo y el 27 % a vacas que recibieron tratamiento de somatotropina. Por otra parte, en el lote testigo, el 88 % de los lavados no presentaron ninguna respuesta, el 11 % se clasificaron como pobres y ninguno alcanzó la clasificación de bueno mientras que en el lote que recibió el tratamiento de somatotropina los resultados fueron de 33 % para cada categoría (figura 8).

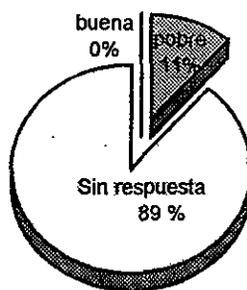
FIGURA 8

EVALUACION DE LA RESPUESTA DE ACUERDO A CONTEO DE EMBRIONES TRANSFERIBLES EN EL LOTE TRATADO Y TESTIGO EN LA EPOCA DE LLUVIAS

LOTE DE TRATAMIENTO



LOTE TESTIGO



Buena: > 3.5 embriones

Mal: < 3.5 embriones

Sin respuesta: 0 embriones

En los cuadros 10 y 11 se presentan los resultados de la superovulación en cada vaca, para ambos lotes y durante los dos periodos de estudio. En la época de secas hubo 3 vacas del lote testigo que no pudieron ser lavadas ya que fue imposible atravesar el cérvix, sin embargo, la respuesta superovulatoria en función de la cantidad de cuerpos lúteos fue similar a las de las otras vacas del mismo grupo, por esta razón fueron incluidas en el trabajo de la época de lluvias. Además con la finalidad de comprobar si esa imposibilidad para realizar los lavados se debía a un efecto de época o realmente a la imposibilidad física de atravesar el cérvix. De igual forma se demuestra la existencia de hembras en las que no se obtuvo ningún embrión transferible ($n=7$, 21 %) en ninguna de las dos épocas, por lo cual se pueden calificar como malas donadoras de embriones.

CUADRO 10

RESULTADO DE LAVADOS UTERINOS PARA COLECCION DE EMBRIONES
EPOCA DE SECAS

IDENTIFICACION	NO. CL's	No. Embriones/óvulos	Transferibles
VACAS CON SOMATOTROPINA			
2	6	0	0
72	11	6	0
157	12	8	0
194	11	2	2
856	8	6	6
858	16	0	0
869	9	1	1
TOTAL	73	23	9
VACAS TESTIGO			
115	8	NO SE LAVO	^x
140	4	NO SE LAVO	^x
160	9	NO SE LAVO	^x
70	4	0	0
661	2	0	0
725	7	1	0
726	6	1	0
868	13	13	11
TOTAL	53	15	11

^x: No fue posible atravesar el cérvix

CUADRO 11
RESULTADOS DE LAVADOS UTERINOS PARA LA COLECCIÓN DE EMBRIONES
EPOCA DE LLUVIAS

IDENTIFICACION	NO. CL's	No. Embriones/óvulos	Transferibles
VACAS CON SOMATOTROPINA			
70	11	7	6
115	11	7	7
140	9	4	0
160	8	0	0
517	12	8	2
518	14	2	0
661	10	7	7
726	6	2	2
868	12	2	2
TOTAL	93	39	26
VACAS TESTIGO			
2	13	1	0
72	9	1	0
118	10	5	0
157	8	2	0
194	11	1	0
262	8	0	0
856	9	2	2
858	9	6	0
869	19	0	0
TOTAL	96	18	2

8. DISCUSION

8.1 DINAMICA FOLICULAR

En la época de secas no hubo diferencias significativas en cuanto a la dinámica en la población folicular entre ambos tratamientos ($p>0.05$), aunque después de la aplicación de somatotropina en el lote tratado apareció una clara tendencia hacia un aumento en el número de folículos clase 1 (> 4 mm). Estos resultados no concuerdan con lo descrito por Carter *et al.*, (1998) quienes encontraron diferencias significativas ($p=0.05$) en el número de folículos pequeños después de la aplicación de somatotropina bovina en hembras Nelore ciclando y no ciclando. Tampoco coincide con lo descrito por Gong *et al.*, (1993) en vaquillas Hereford-Friesian, en donde encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.01$) en cuanto a la población de folículos pequeños luego de la aplicación de STb y ninguna diferencia al comparar las poblaciones de folículos medianos y grandes. En el trabajo de Gong *et al.*, (1993) se detectó esta diferencia en el número de folículos 24 horas después de alcanzar las máximas concentraciones de GH, IGF's e insulina circulantes, lo cual sucedió aproximadamente 60 horas después de la aplicación de la STb. Ese tiempo transcurrido para este evento coincide con lo encontrado en el presente trabajo ya que el aumento en el número de folículos pequeños (aunque no en forma significativa) fue determinado 72 horas después de la aplicación de STb.

De otro lado si coincide con lo reportado por Lucy *et al.*, (1993) en vaquillas Holstein lactantes, quienes encontraron diferencias significativas en cuanto a la población folicular menor a 5 mm entre animales tratados con 25 mg diarios de STb frente a las tratadas con solución salina; sin embargo, en ese estudio la diferencia entre folículos de clase 1 no fue constante al pasar estos folículos a clase 2. En otro trabajo conducido por De la Sota *et al.*, (1993) en vacas Holstein lactantes y vaquillas no lactantes, encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) en la cantidad de folículos pequeños para las vaquillas y en folículos medianos para animales adultos. Por el contrario Kirby *et al.*, (1997) no

encontraron diferencias significativas en la población folicular al comparar animales tratados con 500 mg de STb y animales no tratados, aunque también reportan una tendencia hacia un aumento en los folículos de clase I en el lote tratado ($p=0.07$). De acuerdo con Gong *et al.*, (1993), este aumento se debió a que los tratamientos con somatotropina inducen una elevación en las concentraciones circulantes de hormona del crecimiento e Insulina. De acuerdo con Webb *et al.*, (1999), estos factores están directamente relacionados con la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, jugando un papel importante en la morfogénesis, crecimiento celular, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis. Al parecer, un incremento en estos factores de crecimiento acelera la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y de la teca (Carson *et al.*, 1989) permitiendo de esta forma que se aumenten los receptores para gonadotropinas (FSH-LH). En el presente trabajo no se midieron las concentraciones de IGF's circulantes, por lo cual no se puede asegurar que la aplicación de somatotropina indujo un aumento lo suficientemente grande en las concentraciones de IGF's que se viera reflejado en el número de folículos clase I después de la aplicación de somatotropina.

La población folicular clase I presente en los ovarios al momento de iniciada la superovulación no se relacionó con la respuesta superovulatoria en ninguna de las dos épocas ($r = 0.016$, $p=0.95$ para la época seca y $r = 0.17$, $p=0.49$ para la época de lluvias). Estos resultados no coinciden con lo reportado por Romero *et al.*, (1991) quienes evaluaron esta relación en 59 hembras encontrando una correlación significativa ($r = 0.31$, $p<0.02$). Estos autores concluyeron que los animales con más de 7 folículos pequeños (< 5 mm) al inicio de la superovulación tuvieron mayor respuesta superovulatoria y mayor número de embriones que aquellos animales con menos de 3 folículos de igual tamaño ($p<0.05$); razón por la cual la adición de somatotropina a los tratamientos superovulatorios puede inducir una mejor respuesta (Gong *et al.*, 1993) al estar presentes en el ovario una mayor cantidad de folículos que pueden continuar el desarrollo hasta folículos preovulatorios en presencia de hormonas superovuladoras. Aunque este efecto no ocurrió en el presente trabajo posiblemente porque más del 75 % de las vacas presentaron menos de 6 folículos

pequeños (clase 1) al momento de iniciada la superovulación, esto indica que animales bajo los sistemas de producción tradicional en el trópico, presumiblemente poseen una menor población folicular comparada con la que presentan los animales en condiciones de medio ambiente templado bajo un diferente sistema de manejo y/o de alimentación. Al respecto Figueiredo *et al.*, (1997), reportaron que las vacas Nelore poseen el mismo patrón de ondas foliculares que animales del tipo *Bos taurus* aunque poseen un menor número de folículos reclutables.

8.2 SINCRONIZACION

En la época de secas hubo una respuesta al tratamiento con progestágenos y estradiol (Sincromate B) del 81 % y en la época de lluvias del 100 %. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Bolaños *et al.*, (1997) quienes reportaron respuestas del 52 %; tampoco con lo encontrado por Orihuela *et al.*, (1989) quienes obtuvieron una respuesta del 70 % trabajando con vacas Cebú. Por el contrario, los resultados del presente estudio coinciden con lo encontrado por Odde, (1990) quien en una revisión de literatura sobre sincronización reporta respuestas del 75 al 100 % al utilizar la combinación de progestágenos y estradiol (SMB). En el presente trabajo las vacas se encontraban en buena condición corporal (entre 2.5 y 5 en la escala descrita por Pullan, 1978) y no lactantes, siendo estos factores (nutrición y amamantamiento) los que mas influyen en la baja respuesta a celo en bovinos del trópico (Randel, 1984). Otro factor involucrado al determinar la respuesta a celo es el referente al personal encargado de la detección; en el presente trabajo las detecciones se realizaron en forma continua durante 48 horas, por médicos veterinarios y en lotes de pocos animales (10 vacas), lo cual genera tasas de detección altas (81 y 100 %); es probable que sea este factor el que determine las discrepancias entre el presente estudio y los arriba citados.

Por otro lado, durante la épocas de secas y lluvias hubo un 16 y 18 % respectivamente de animales que no presentaron cuerpo lúteo (determinado por palpación rectal y ultrasonido) 9 días después de manifestados los signos de celo, lo cual sugiere la incidencia de celos anovulatorios en el ganado cebuino. Esto concuerda con lo descrito por Gutiérrez *et al.*, (1995) quienes trabajando con animales cebuinos, reportaron un 19 % de animales con celos anovulatorios e indicaron que la causa posible fue una inadecuada secreción de LH. Resultados similares encontraron Barros *et al.*, (1996) en hembras Nelore de Brasil sincronizadas con SMB, en donde encontraron un 20 % de celos anovulatorios. Resultados similares reportaron Plasse *et al.*, (1968) en animales *Bos indicus* ya que obtuvieron un 8 % de celos anovulatorios en verano y 3 % en invierno. Al respecto Orihuela *et al.*, (1989) argumentaron que la demostración de signos de celo sin ovulación puede originarse por fenómenos de imitación conductual aunque también pueden deberse al tipo de tratamiento utilizado para la sincronización (progestágeno y valerato de estradiol). Esto se debe a que los niveles de estradiol administrados el primer día persisten hasta el retiro del implante, de tal forma que al retirar la fuente de progestágeno, y al haber altas concentraciones de estradiol, se desencadena la conducta de celo anovulatorios.

8.3 RESPUESTA SUPEROVULATORIA

En la época de secas la respuesta a la superovulación medida en cantidad de cuerpos lúteos se puede calificar como regular, no encontrándose diferencias significativas ($p=0.062$) entre el grupo tratado y el testigo, sin embargo, si se observó una clara tendencia a mayor número de cuerpos lúteos en el lote tratado con somatotropina. En la época de lluvias, aunque los animales se encontraban en mejores condiciones de alimentación debido a la suplementación ofrecida, tampoco se presentaron diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos ($p=0.72$). Por otra parte, se observaron diferencias entre las dos épocas en los lotes testigos ($p=0.02$) excepto entre los lotes testigos en ambas épocas. Este

nómeno demuestra que el cambio de época y la suplementación mejoraron la respuesta superovulatoria; de igual forma se encontraron diferencias significativas entre el lote testigo en la época de secas y el lote tratado en la de lluvias ($p=0.03$), indicando que la adición de somatotropina sin suplementación (época de secas) fue suficiente para lograr una respuesta similar a la encontrada en la época de lluvias. No obstante, para confirmar este hallazgo se requiere una investigación con un mayor número de animales en los tratamientos. Tampoco se encontraron diferencias en la respuesta entre las vacas que estaban ciclando o no hasta el momento de empezar la superovulación en ambas épocas; esto indica que las vacas que se encuentran en anestro pero presentan un cuerpo lúteo inducido por un tratamiento sincronizador (progesterona-estrógenos) el día de iniciado la superovulación producen respuestas satisfactorias medidas en la cantidad de cuerpos lúteos, aunque para demostrar este efecto se necesitaría un experimento dedicado exclusivamente a comprobar esta hipótesis.

En el presente trabajo el total de cuerpos lúteos encontrados en ambos grupos durante la época de lluvias y en el grupo de tratamiento de la época de secas coinciden con lo reportado por Carvalho *et al.*, (1996) para vacas Nelore en Brasil, en donde de un total de 20 superovulaciones usando Follitropin-V, obtuvieron en promedio 12.7 cuerpos lúteos el día de la recuperación embrionaria. Esos resultados representan casi el doble de lo encontrado en el presente estudio para el lote testigo durante la época de secas, lo cual indica que la adición de somatotropina y/o la suplementación alimenticia producen buenas respuestas superovulatorias. En el trabajo de Shea *et al.*, (1984) utilizaron una gran cantidad de tratamientos a lo largo de 10 años de trabajo (1972 a 1982) y reportaron una media de 10.3 cuerpos lúteos en 6000 superovulaciones sin encontrar diferencias en función del año, ni mes en que se llevaron a cabo los trabajos, aunque si hubo diferencias significativas debido a las variaciones causadas por el tipo de gonadotropina usada (diversas hormonas) y a la posible variación entre lotes de una misma hormona, a la eficacia en la determinación de los cuerpos lúteos y a la respuesta del animal a dicha gonadotropina. En ese trabajo se argumenta que una gran cantidad de animales respondieron de manera

satisfactoria en una estimulación pero posteriormente tuvieron respuestas deficientes usando el mismo protocolo superovulatorio.

En Canadá Rieger *et al.*, (1991), no encontraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de cuerpos lúteos en vaquillas Holstein tratadas con somatotropina y testigo ($p=0.12$) aunque también advierten una tendencia hacia una mayor producción en el lote tratado, similarmente a lo reportado en el presente trabajo. En el trabajo de Rieger *et al.*, (1991) la somatotropina se aplicó en dosis diarias de 40 mg durante los días de aplicación del Folltropin, sin embargo (Gong *et al.*, 1993) demostraron que para esperar una respuesta positiva de la adición de somatotropina en los tratamientos superovulatorios, esta debe hacerse unos días antes a la primera aplicación de hormona foliculoestimulante. En el estudio de Rieger *et al.*, (1991) se determinó que las vaquillas tratadas con somatotropina presentaron respuestas más uniformes que las del grupo testigo ya que el 100 % de los animales con somatotropina respondieron al tratamiento superovulatorio mientras que en el lote testigo el 21 % de animales no presentaron ninguna respuesta. Esto no coincide con el presente trabajo en donde se obtuvo una respuesta del 100 % (más de 1 cuerpo lúteo 7 días después del celo) de las vacas que recibieron el protocolo superovulatorio.

En contraste a lo encontrado al usar Folltropin, varios estudios en los que se usó PMSG no han demostrado el efecto positivo de la somatotropina en los protocolos superovulatorios. Al respecto Herrel *et al.*, (1990) en 30 hembras Holstein compararon 2500 UI de PMSG contra al mismo protocolo adicionado de 640 mg de STb aplicada 5 días antes de la superovulación sin encontrarse diferencias significativas ($p>0.05$) en la cantidad de cuerpos lúteos (12.2 en el tratado frente a 10.2 en el testigo). Por otro lado Gong *et al.*, (1993) compararon el esquema tradicional de superovulación con 2000 UI de PMSG frente a ese mismo esquema adicionado de somatotropina; y obtuvieron en promedio de 12.5 y 23.2 cuerpos lúteos respectivamente ($p<0.01$) para cada grupo, asimismo las diferencias en el número de vacas con pobre respuesta estuvieron a favor de la somatotropina ($p<0.05$).

Gong *et al.*, (1993) acreditaron la diferencia en el número de folículos pequeños inducidos por el pretratamiento de STb al hecho de que solo terminan el crecimiento aquellos folículos que ya habían iniciado el desarrollo al recibir la gonadotropina exógena.

Los resultados del presente trabajo también demuestran que la respuesta superovulatoria al utilizar el protocolo tradicional de Folltropin adicionado de somatotropina es bastante aceptable ya que el 100 % animales respondieron al tratamiento; sin embargo, las respuestas no son 100 % iguales ya que solo se clasificaron como buenas el 33 y 55 % de los lavados en la época de secas y de lluvias respectivamente. Probablemente la variación individual de las vacas sea uno de los factores que más afectan la respuesta a los tratamientos de este tipo como fue demostrado por Shea *et al.*, (1984). De igual forma la adición de somatotropina en ambas épocas produjo un mayor número de respuestas calificadas como buenas comparadas con el tratamiento tradicional (80 % frente a 20 % en la época de secas y 60 % frente a 40 % en la época de lluvias). Esta diferencia se puede deber al aumento en la cantidad de folículos reclutables cuando se utilizó somatotropina, con lo cual se incrementaría la cantidad de folículos que ovulan, sin embargo esto no se comprobó en el presente trabajo.

8.4 ESTRUCTURAS RECUPERADAS

En cuanto a la cantidad de estructuras recuperadas (embriones/óvulos), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) al comparar la respuesta entre el lote tratado y testigo en la época de secas ni en la de lluvias. Estos resultados no coinciden con lo reportado por Rieger *et al.*, (1991) quienes encontraron diferencias significativas al comparar vacas Holstein tratadas con Folltropin ($n=18$) y con Folltropin y la adición de 40 mg diarios de somatotropina bovina aplicada con cada dosis de la hormona superovulatoria (total STb=

160 mg). El autor atribuye esta diferencia a que la aplicación de somatotropina rescató algunos folículos de la atresia y permitió su desarrollo, sin embargo en este estudio la proporción de folículos viables fue inferior en el lote de somatotropina lo que indica que posiblemente esos folículos rescatados de la atresia sí lograron su ovulación pero tenían una calidad inferior por lo cual no se tradujo en embriones viables. A este respecto Rieger *et al*, (1991) argumentan que se tendría que realizar la misma investigación aumentando la cantidad de animales en cada tratamiento.

Por el contrario, si coincide con lo reportado por Herrel *et al*, (1990) quienes no encontraron diferencias estadísticas en cuanto a la cantidad de estructuras recuperadas en 30 vacas Holstein. También existe una marcada coincidencia en cuanto a los porcentajes de recuperación reportados por Rieger *et al*, (1991) quienes obtuvieron un 53 y 44 % de recuperación para el lote tratado y control respectivamente, mientras que en el presente trabajo los porcentajes de recuperación fueron 31 (tratado), 46 % (testigo) en la época de secas y, 42 (tratado) y 18 % (testigo) en la época de lluvias respectivamente, lo que demuestra las variaciones tan grandes que existen entre colecciones, aun cuando estas son realizadas por el mismo técnico, sin existir una causa conocida. El presente trabajo también demuestra la existencia de animales en los que no se recupera ninguna estructura (33 % en la época de secas y 20 % en la de lluvias) presumiblemente por problemas anatómicos como el caso de *cervix tortuoso* (González *et al*, 1983), el cual impide la realización del lavado uterino o dificulta la realización adecuada del lavado. También se puede deber a la dificultad que tienen los embriones para llegar al útero al atravesar el oviducto ya que su paso está regulado por contracciones en todas direcciones que están influenciadas por la presencia de estrógenos, los cuales presentan concentraciones superiores a las fisiológicas causadas por la presencia de folículos persistentes que no ovularon, tal como lo demostraron Monniaux, Chupin y Saumande en 1983 quienes argumentaron que estos folículos generan cantidades no fisiológicas de estradiol, lo que podría causar una alteración en el patrón de movimientos del oviducto durante los primeros días pos inseminación, pudiendo alterar la llegada de los ovocitos al sitio de fertilización en el oviducto; de esta

forma gran parte de los ovocitos no llegan al útero alterando los porcentajes de recuperación. De igual forma este exceso de estrógenos también puede ser el responsable de la gran cantidad de embriones no viables presentes en las recolecciones uterinas como se mencionó anteriormente. Esta teoría no puede ser demostrada en el presente trabajo ya que no se midieron los niveles de estrógenos durante el celo ni durante los primeros días de desarrollo embrionario aunque si se determinó la presencia de folículos anovulatorios 4 días después de la inseminación artificial en la época de lluvias. En esta época existieron 4 vacas con 2, 3 ó 4 folículos de gran tamaño en el lote de tratamiento (n=9) y 4 vacas con 2 ó 3 folículos anovulatorios en el lote testigo (n=9).

En un trabajo realizado por Gong *et al.*, (1993) encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) al adicionar 320 mg de STb a los tratamientos superovulatorios de PMSG (7.4 estructuras frente a 3.8). Shea *et al.*, (1984), en el trabajo antes mencionado, encontraron una media de 5.97 estructuras recuperadas sin encontrar efecto del año ni del mes en que se realizaron los lavados. Los porcentajes de recuperación variaron entre el 58 al 65 %, siendo estos un poco superiores a los encontrados en el presente trabajo. Shea *et al.*, (1984) argumentaron que la diferencia en los porcentajes de recuperación se deben al tipo de colección (quirúrgica o no quirúrgica) y a la experiencia del técnico encargado, en el presente estudio tales factores estuvieron controlados.

Freitas *et al.*, (1997) realizaron en Brasil 112 lavados uterinos en animales Gyr, obteniendo 983 estructuras con media de 8.7 por lavado. Estos valores son considerablemente mayores a los encontrados en el presente trabajo y se debe posiblemente a que las vacas Gyr utilizadas pertenecían a un hato seleccionado para tal fin, con lo cual se descartaron las hembras que pudieran tener respuestas inferiores. Este tipo de selección no se llevó a cabo en el presente trabajo. En otro trabajo realizado en Brasil con vacas cebú (Carvalho *et al.*, 1996) encontraron una media de 7.8 estructuras colectadas y un porcentaje de recuperación

el 61 %. En ese trabajo las vacas se sacrificaron 8 días después del apareamiento para realizar la recolección embrionaria, razón por la cual el porcentaje de recuperación es considerablemente mas alto que el obtenido en el presente trabajo.

8.5 EMBRIONES TRANSFERIBLES

La cantidad de embriones transferibles en el presente trabajo fue considerablemente inferior a lo reportado por Carvalho *et al.*, (1996) quienes encontraron 6.3 ± 0.5 embriones transferibles y a lo encontrado por Freitas *et al.*, (1997), (3.3 embriones transferibles) en animales cebuinos: la diferencia entre estos trabajos y el presente ya fue discutida. Por otro lado, Rieger *et al.* (1991) compararon Folltropin y Folltropin adicionado de 160 mg de STb sin encontrar diferencias significativas ($p=0.78$) para embriones transferibles.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los encontrados en aquellos en los que se utilizó PMSG para inducir la superovulación. Herrel *et al.*, (1990) tampoco encontraron diferencias en el promedio de embriones transferibles en vacas superovuladas con PMSG y vacas superovuladas con PMSG adicionado de 640 mg de STb.

De igual forma Shea *et al.*, (1984), no encontraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de embriones transferibles por año ni por mes en que se realizó el trabajo. Por el contrario, Bastidas y Randel, (1987) en un total de 1841 superovulaciones en vacas Brahman a lo largo de 7 años reportaron que la cantidad de embriones transferibles por vaca está afectada por la estación del año ($p<0.06$) y también por el mes del año ($p<0.06$). El número de embriones transferibles en dicho trabajo fue menor durante el invierno y mayor durante el otoño, primavera y verano. De igual forma reportaron que la mayor cantidad de embriones viables se presentó durante los meses de marzo a octubre decreciendo durante

noviembre y diciembre. De acuerdo con Bastidas y Randel, (1987), esta diferencia se debe a una mayor disponibilidad de alimentos. Randel, (1984), ya había demostrado que en esos mismos meses las vacas *Bos indicus* presentan mayores índices de fertilidad.

Según McClure, (1994), el aumento en la disponibilidad de nutrientes causado por la suplementación alimenticia puede influir favorablemente sobre la respuesta ovulatoria y cantidad de embriones transferibles ya que el metabolismo del tracto reproductivo, óvulos y embriones requiere de energía para realizar con éxito sus funciones. En efecto, Gutiérrez *et al.*, (1997c) demostraron que un incremento en el aporte nutricional puede aumentar el número de folículos pequeños (< 4 mm) en el ovario. Esta energía proviene de la glucosa producida en el organismo a partir de los ácidos grasos volátiles. El suministro de suplemento basado en granos altera el patrón de formación de estos ácidos aumentando la proporción de propiónico, el cual es precursor de glucosa. De igual forma, la transformación hacia ácidos grasos volátiles y glucosa necesitan enzimas, coenzimas y diversos factores, los cuales provienen del alimento ingerido. Es aquí en donde los minerales, amino-ácidos y vitaminas incorporados a la dieta se vuelven esenciales. En el presente trabajo no se midieron los aportes de energía, proteína, vitaminas y minerales hechos por el pasto por lo cual se hace imposible comprobar un determinado efecto de la suplementación sobre la respuesta superovulatoria, de esta forma es imposible deslindar el efecto nutricional del efecto época

Gong *et al.*, (1993) no encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto a embriones transferibles al adicionar Somatotropina al protocolo superovulatorio, pero si encontraron diferencias significativas en cuanto al número de estructuras recuperadas, lo cual indica que existió un claro aumento ($p < 0.05$) en los porcentajes de viabilidad, siendo del 90 % para el lote testigo y del 48 % para el que recibió la somatotropina. Gong *et al.*, (1993) atribuyen esta diferencia a un aumento en los niveles de estrógenos circulantes causado por el excesivo número de folículos que maduraron en el lote pretratado con STb.

lo que posiblemente resultó en una falla en los procesos de fertilización de los ovocitos o en el subsiguiente desarrollo embrionario. Como ya se mencionó anteriormente, este exceso de estrógenos también puede originar una falla en los procesos de traslado de los embriones a través del oviducto, en cuyo caso no se recuperarían los embriones producidos.

Al determinar la calidad de la respuesta en embriones transferibles en la época de secas, se determinó que el 66 % de las colecciones no produjeron embriones transferibles mientras que solo el 16 % se pueden considerar como respuestas buenas, por otro lado en la época de lluvias, el 61 % de las colecciones tampoco produjeron estructuras transferibles y nuevamente solo el 16 % se consideraron como buenas. Esta calidad en la respuesta no coincide con lo encontrado por Mapletoft *et al.*, (1990) reportaron en un total de 2048 colecciones realizadas en animales Holsteín, que el 24 % no produjeron ninguna estructura y solo el 30 % de las colecciones produjeron el 70 % de los embriones, presentando respuestas por encima del promedio. Este tipo de inconsistencia en la respuesta solo demuestra el alto grado de variabilidad en la respuesta superovulatoria tanto en animales *Bos taurus* como *Bos indicus* causado principalmente por individualidad de las hembras donadoras como se mencionó anteriormente.

La respuesta obtenida en el presente trabajo en cuanto a la cantidad de embriones transferibles demuestra que la adición de somatotropina aunada a la suplementación alimenticia aumenta la cantidad de embriones transferibles; por otra parte confirma lo mencionado por otros autores sobre la gran variabilidad que existe en la respuesta ya que el 66 % de las colecciones en la época seca y el 61 % en la época de lluvias no produjeron ningún embrión transferible. Aun se desconoce la causa de esta variación aunque podría deberse a que al iniciar el proceso de superovulación, no se conoce exactamente el momento del ciclo en que se encuentran las vacas, de esta forma se inicia la superovulación demasiado tarde en algunos animales, por lo cual se rescatarán algunos folículos de inferior calidad, originando embriones con viabilidad menor (Mapletoft *et al.*, 1990). A este

respecto se recomienda iniciar la superovulación de forma individual y no en forma grupal como se realizó en el presente trabajo. De igual forma Mapletoft *et al.*, (1990) señala que los niveles elevados de progesterona durante el celo son otro factor que puede influir en la variabilidad en cuanto a embriones transferibles, lo cual afectaría la descarga preovulatoria de LH, así como el transporte y la capacitación espermática dando como resultado embriones de menor calidad. De igual forma, después de la ovulación los niveles de progesterona aumentan abruptamente cuanto mayor es el número de cuerpos lúteos de la vaca superovulada. Betteridge *et al.*, (1981/82) relacionaron estos altos niveles de progesterona con la presencia de embriones de mala calidad.

En resumen, se determinó que la adición de somatotropina al tratamiento de Folltropin-V no aumentó la respuesta superovulatoria pero si el número de embriones transferibles en la época de lluvias en donde los animales recibieron complementación. De igual se concluyó que el estado de los animales previo al tratamiento superovulatorio no afectó significativamente la respuesta superovulatoria.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Adams G.P, Matteri L, Kastelic J.P and Ginther O.J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. Journal of Reproduction and Fertility. 1992; 94:177-188.
- Armstrong D, G. Baxter G. Gutiérrez C, G. Hogg C, O. Glazyrin A, L Campbell B, K. Bramley T, A and Webb R. Insuline like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: Effect of gonadotropins and developmental status. Endocrinology. 1998. 139:2146-2154.
- Barros C. M, Pinheiro O. L, Valle E. R, Encarnação R y Figueiredo F. A. Acompanhamento ultra-sonografico da ovulação inducida por syncromate B em vacas Nelore. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, Brasil. 1996; 24:225
- Barros C M, Figueiredo R A y Pinheiro GL. Estro, ovulação e dinamica folicular en zebuinos. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 1995; 19:9-22.
- Bastidas P, Randel R. D. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. Theriogenology. 1987; 28: 531-539.
- Bauman D. E. Bovine somatotropin: Review of an Emerging animal technology. Journal of Dairy Science. 1992; 75: 3432-3451.
- Betteridge K. J, Sugden E. A, Eaglesome M. D, Randall G. C. B and Mitchell D. Plasma progesterone levels in superovulated cattle in relation to hatched embryo size, ovulation rates and premature regression of corpora lutea. Animal Reproduction Science. 1981/82; 4:207-212.
- Bo G. A. Bergfelt, D. R and Mapletoft, R. J. Follicle wave dynamics and superovulation in cattle: recent advances and practical experience. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, Brasil. 1996; 24: 31-53.
- Bolaños J M, Galina C S. Estrada S y Forsberg M. Effect of temporary weaning and progestagen treatment in the advancement of ovarian activity in anestrous zebu cattle. Reproduction of Domestic Animals. 1997; 32:267-272.
- Buratini Jr. J, Price C. A, Bo G. A, Mello M. R. B, Assumpção M. E. O. A, Travers L. M. T and Visintin J. A. Effect of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin on follicular dynamics in Nelore (*Bos indicus*) heifers. Theriogenology. 1999. 51:402.

- to J. H, Macleod G. K, Mcbride B. W. Several efficacy of chronically administered recombinant bovine somatotropin to lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 1990; 73:474-479.
- Arson R. S, Zhang Z, Hutchinson L. A, Herington A. C and Findlay J. K. Growth factors and ovarian function. Journal of Reproduction and Fertility. 1989. 85: 735-746.
- Darter J. A, Paranagua Jr. H. N, Paranagua H. F. N, Godke R. A. The effect of rBST on follicular populations of Nelore Heifers during the dry season in Brazil. Theriogenology. 1998; 49:342.
- Carvalho J. B. P, Alvarez R. H y Miguel O. Efeito do "priming" com FSH na resposta ovariana de vacas superovuladas. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, Brasil. 1996; 24:202.
- Cole W.J, Madse K.S, Hintz R.L y Collier R.J. Effect of recombinantly-derived bovine somatotropin on reproductive performance of dairy cattle. Theriogenology . 1991; 36:573-595.
- De la Sota R.L, Lucy M.C, Staples C.R, and Thatcher W.W. Effects of recombinant bovine somatotropin (Somatotrope) on ovarian function in lactating and non lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 1993; 76:1002-1013.
- Donaldson L. E. The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. Theriogenology. 1984. 22: 97-99.
- Figueiredo R.A, Barros C.M, Pinheiro O.L y Soler J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. Theriogenology. 1997; 47:1489-1505.
- Freitas C, Ferreira A. M , Sa W. F, Camargo L. S. A y Junqueira M. M. Desempenho de vacas Gir na resposta superovulatoria em produção de embriões. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, Brasil. 1997(supl.); 232.
- Fuentes H. V. Los estimulantes de la producción lechera. Memorias del XVI Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Ver. 1991; 257-260.
- Galina C. C and Arthur G. H. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 5. Fertilization and Pregnancy. Animal Breeding Abstracts. 1990; 58:35-43.
- García G. J, K, Seidel G. E Jr and Eldsen R. P. Efficacy of shortened FSH treatment for superovulation cattle. Theriogenology. 1984. 17:90.

García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Tercera edición. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México D.F. 1981; 143-201.

Ginther O.J, Wiltbank M.C and Fricke P.M. Selection of the dominant follicle in cattle. Biology of Reproduction. 1996; 55:1187-1194

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

Gong J.G, Campbell B.K, Bramley T.A and Webb R. Treatment with recombinant bovine somatotropin enhance ovarian follicle development and increase the secretion of insulin like growth factor 1 by ovarian follicles in ewes. Animal Reproduction Science. 1996; 41:13-26.

Gong J.G, McBride D, Bramley T.A and Webb R. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin-like growth factor 1 and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. Journal of Endocrinology. 1994; 143:157-164

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

Gong J.G, McBride D, Bramley T. A and Webb R. Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin like growth factor 1 and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. Journal of Endocrinology. 1993; 139:67-75.

Gong J. G, Bramley T. A and Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. Journal of Reproduction and Fertility. 1993; 97:247-254.

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

González R, Soto-Belloso E y Bohórquez L. Potency of the cervical canal in crossbred female Zebu x Brown Swiss selected for non-surgical recovery or transfer of embryos. Theriogenology. 1983; 19:759-761.

Gutiérrez C. G, Campbell B. K and Webb R. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to FSH and morphological characteristics. Biology of Reproduction. 1997a. 56; 608-616.

Gutiérrez C. G, Campbell B. K, Armstrong D. G and Webb R. Insuline like growth factor-I IGF-I production by bovine granulose cells *in vitro* and peripheral IGF-I measurement in cattle serum: an evaluation of IGFBP extraction protocols. Journal of Endocrinology. 1997b. 153: 231-240.

Gutiérrez C, G. Oldham J. Bramley T, A. Gong J, G. Campbell B. K and Webb R. The recruiment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. Journal of Animal Science. 1997c. 75:1876-1884.

Gutiérrez C. G, Armstrong D. G, Campbell B. K. Hogg C, O and Webb R. Insuline like growth factor (IGF) I production and expression of IGF-I and II by bovine granulose and theca cells *in vivo* and *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility. 1996. Abstr 66. Series 17.

Gutiérrez C. G, Galina C. S, Zarco L y Rubio I. Evaluation of ovarian activity in Gyr and Indobrasil crossbred Holstein heifers during the months of march to june in the wet tropics of México. Int. Journal of Animal Science. 1995; 10:17-20.

Gutiérrez C, G. Ralph J, H. Telfer E, E. Wilmut I and Webb R. Growth and Antrum formation of Bovine Preantral Follicles in Long-term Culture in Vitro. Biology of Reproduction. 2000. In press

Hafez E. S. E, Sugie T and Hunt W. L. Superovulation and related phenomena in the beef cow. II. Effect of estrogen administration on production of ova. Journal of Reproduction and Fertility. 1963; 5: 381-388.

Herrel A, Farries E and Niemann H. A trial to stimulate insulin like growth factor 1. Levels to improve superovulatory response in dairy cows. Theriogenology 1990; 33:248.

Kirby J. C, Smith M. F, Keisler D. H and Lucy M. C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin Journal of Dairy Science. 1997; 80:273-285.

Leibo S. P. A one step method for direct non surgical transfer of frozen thawed bovine embryos. Theriogenology. 1984; 21:767.

Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Hensche T and Meredith S. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. Journal of Animal Science. 1986. 63: 176-183.

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

Lindsell C. E, Murphy B. D and Mapletoft R, J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. Theriogenology. 1986; 26:209-219.

Lucy M. C, Savio J. D, Badinga L, De la Sota R. L and Thatcher W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. Journal of Animal Science. 1992; 70:3615-3626.

Madalena FE. La utilización sostenible de hembras F1 en la producción del ganado lechero tropical. Estudio Producción y Sanidad animal n°111, FAO, Roma. 1993.

Mapletoft R.J, Pawlyshyn V, Garcia A, Bo G.A and Willmott J. Comparison of four different gonadotropin treatments for inducing superovulation in cows with 1:29 translocation. Theriogenology. 1990; 33: 282.

McClure T. T. Reproductive Physiology. In: Nutritional and Metabolic Infertility in the cow. Cab International. Singapore. 1994: 15-18.

McGowan M: R, Braithwaite M, Jochle W and Mapletoft R. J. Superovulation of beef cattle with Pergonal (hMG): A dose response trial. Theriogenology. 1985. 24 : 173-184.

McGuire M. A, Vicini J. L, Bouman D. E, and Veenhuizen J.J. Insuline-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. Journal of Animal Science. 1992. 70: 291-2910.

Monget P.. and Monniaux D. Growth factors and the control of folliculogenesis. Journal of Reproduction and Fertility. 1995. 49 : 321-333.

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

Monniaux D, Chupin D and Saumande J. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology. 1983. 19:55-82.

Morris D.G, McDermott M.G and Diskin M.G. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine alfa-subunit on ovulation rate and twin-calving rate in heifers. Journal of Reproduction and Fertility. 1995; 97:255-261.

Murphy B. D y Pescador N. Métodos para mejorar la respuesta ovulatoria en el ganado. Memorias del Séptimo Curso Internacional de Reproducción Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México D.F. 1997; 87-100.

Murphy B.D, Mapletoft R. J, Manns J and Humphrey W, D. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. Theriogenology. 1984. 21: 117-125.

Odde K G. A review of synchronization of estrous in postpartum cattle. Journal of Animal Science. 1990. 68:817-830.

Orihuela A, Galina C. S and Duchateau A. The efficacy of estrous detection and fertility following synchronization with PGF₂ α or Sincromate B in zebu cattle. Theriogenology. 1989; 32:745-753.

Plasse D, Warnick C and Koger M. Reproductive behavior of *Bos indicus* females in a subtropical environment. Length of estrous cycle, duration of estrous, time of ovulation, fertilization and embryo survival in grade Brahman Heifers. Journal of Animal Science. 1968; 27:94-100.

Pullan, N. B. Condition scoring of fulani cattle. Tropical Animal Health and Production. 1978; 10: 118-120.

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

Rieger D, Sunderland S. J and Martin T. T. The effect of co-treatment with bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. Theriogenology. 1991; 35:863-868.

Romero A, Albert J, Brink Z and Seidel G.E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. Theriogenology. 1991. 35:265.

Rubio I, Moreno I.Y.D, Galina C.S, Escobar F.J, Ramírez B y Navarro-Fierro R. Progesterona sérica, expresión de estro y fertilidad después de la inyección de prostaglandina F₂ alfa en ganado cebú en verano e invierno. Veterinaria México. 1989:20. 145-149.

Saumande J, Chupin D, Mariana JC, Ortavant R and Mauleon P. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. In: Control of Reproduction in the cow, Sreenan JM ed. 1978: 195-224.

Savio J. D, Keenan L, Boland M. P and Roche J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the estrus cycles of heifers. Journal of Reproduction and Fertility. 1988; 83:663-671.

Schimt E.J.P, Drost M, Diaz T and Thatcher W.W. Effect of a gonadotropin-releasing hormone against on follicle recruitment and pregnancy rate in cattle. Journal of Animal Science. 1996; 74:154-161.

Shea B. F. Evaluating the bovine embryo. Theriogenology. 1981; 15:31-35.

Shea B.F, Janzen R. E, and McDermand D. P. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. Theriogenology. 1984; 21:186-195.

Silva A. P and Machado E. A. Eficacia de diferentes produtos comerciais superovulatórios em programa de T.E em um rebanho Nelore/Nelore mocho. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, Brasil. 1996; 24: 216.

Tribulo H, Bo G.A and Mapletoft R.J. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. Theriogenology. 1991; 35:286.

Visintin J. A, Arruda R. P, Madureira E. H, Mizuta K and Celeghini E. C. C. Effect of different doses of FSH/LH on superovulatory response in Nelore heifers. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, Brasil. 1996; 24:222.

Webb R, Gong J, G and Bramley T, A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. Theriogenology. 1999. 41:24-30.

Zeitun M.M, Rodríguez H. F and Randel R.D. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. Theriogenology. 1996; 45:1577-1851.