



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA OVÁRICA A LA SUPEROVULACIÓN
EN GANADO BOVINO CRIOLLO MEXICANO UTILIZANDO DOSIS REDUCIDAS
DE UNA PREPARACIÓN ESTANDARIZADA DE FSH-LH**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA:

FERNANDO VILLASEÑOR GONZÁLEZ

TUTOR:

DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ
CENTRO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS, INIFAP

COMITE TUTOR:

DR. HÉCTOR RAYMUNDO VERA ÁVILA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DISCIPLINARIA EN FISIOLÓGIA Y MEJORAMIENTO
ANIMAL, INIFAP

DR. GUILLERMO MARTÍNEZ VELÁZQUEZ
CAMPO EXPERIMENTAL SANTIAGO IXCUINTLA, INIFAP

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO AGOSTO DE 2015



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.

DEDICATORIA

A mi esposa Cristina, a mis hijos Fernando y Jimena, quienes han sido mi apoyo incondicional, mi alegría y mi mayor motivación para mejorar en todos los aspectos de mi vida día a día.

A mis padres Fernando Villaseñor Ruiz(†) y María de Jesús González Martín, por haberme dado la vida y por haberme enseñado a trabajar y ser un hombre de bien con su ejemplo.

A mis hermanos: Edgar, Gaby y Mymy, por ser las personas con las sé que siempre puedo contar para compartir mis tristezas y alegrías.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor: El Doctor José Fernando De La Torre, por su paciencia, entrenamiento y apoyo en mi formación académica desde el nivel licenciatura, además, por su gestión en la obtención de recursos económicos para realizar el experimento además por todos los consejos importantes de vida que me ha brindado.

A mi comité tutor: A los Doctores Héctor Vera y Guillermo Martínez, por su aporte de experiencia y conocimientos científicos, que fueron necesarios para la retroalimentación de este trabajo. Al Dr. Guillermo también por el apoyo económico para realizar el experimento.

A mis sinodales: Los Doctores: Everardo González Padilla, Fernando De La Torre, Salvador Romo, Eugenio Villagomez y Ana María Torres, por su tiempo y disponibilidad en la revisión del trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por abrirme sus puertas y permitirme formar parte de su comunidad estudiantil, así como a todos los docentes que fueron parte de mi capacitación de posgrado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias (INIFAP), por darme apoyo, facilidades y la oportunidad de capacitarme para desempeñar de la mejor manera el quehacer institucional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico durante los estudios de posgrado.

Además, a todas las personas con las que coincidí en el laboratorio acuático-pecuario del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP: Investigadores, tesistas, encargados de laboratorio y prestadores de servicio social, por su apoyo para realizar el trabajo experimental.

Por último, agradezco a los investigadores del Sitio Experimental "El Verdineño" y a su personal de apoyo, por todas las facilidades que se me brindaron para realizar la fase experimental de este trabajo.

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la respuesta ovárica a la superovulación y la producción embrionaria en ganado bovino Criollo de Nayarit o Criollo Coreño, usando tres dosis reducidas de una preparación estandarizada de FSH-LH (Folltropin-V®). El trabajo se realizó en el Sitio Experimental El Verdineño del INIFAP, usando 6 vaquillas y 12 vacas en 2 diferentes experimentos. La edad de las donadoras en cada grupo fue de 3 ± 0.34 y 12.4 ± 2.93 años en promedio. Se asignaron tres tratamientos a las donadoras consistiendo en dosis totales de 280 mg (T1), 200 mg (T2) y 140 mg (T3) de FSH, aplicadas en protocolo de dos inyecciones diarias en dosis decreciente durante cuatro días. En el día tres de superovulación, se aplicó PGF₂alfa en dos ocasiones. Se aplicaron tres servicios de IA a las 12, 24 y 36 h post-detección del celo. A los 7 días post-celo, se evaluó el número de cuerpos lúteos en ambos ovarios con el apoyo de un ultrasonido. La colección de embriones se realizó por técnica no quirúrgica. Las variables de respuesta evaluadas fueron: número de cuerpos lúteos, corpúsculos recuperados (embriones transferibles y no transferibles + óvulos no fertilizados); embriones transferibles; embriones no transferibles, óvulos no fertilizados, niveles séricos de progesterona, porcentaje de fertilización, volumen ovárico, porcentaje de recuperación y porcentaje de de animales que dieron por lo menos 1 embrión transferible. El modelo estadístico incluyó los efectos fijos de tratamiento (T1, T2 y T3), vaquilla/vaca (6 y 12) y período (tres periodos). Cada unidad experimental recibió diferente tratamiento en superovulaciones sucesivas (3). Se utilizó un diseño experimental crossover simple balanceado y la información se analizó con el procedimiento GLM del SAS. Las vacas presentaron mejor respuesta a la superovulación, pero un bajo porcentaje de fertilización; lo contrario ocurrió con las vaquillas (baja respuesta pero alta tasa de fertilización). No se encontraron diferencias en las tres dosis evaluadas y en general la producción de embriones transferibles fue baja comparada con razas modernas de alta producción, pero similar a lo que se ha obtenido con razas localmente adaptadas en otras regiones del mundo. En base a los resultados, cualquiera de las dosis evaluadas puede ser utilizado en animales en mismos rangos de edad, esperando resultados similares, con la ventaja en el costo para las dosis menores.

Palabras clave: Bovinos, Superovulación, Embriones transferibles, Criollo Coreño.

ABSTRACT

This study was performed with the aim to evaluate the ovarian response to superovulation and embryo production in Criollo cattle from Nayarit State, also known as Criollo “coreño”, using three reduced doses of a standardized preparation of FSH-LH (Folltropin V®). The work was conducted at the Experimental Station “El Verdineño”, belonging to INIFAP, using 6 heifers and 12 cows in two different experiments. The average age of the donors in each group was 3 ± 0.34 and 12.4 ± 2.93 . Three treatments were assigned to the donors, consisting in total FSH doses of 280 mg (T1), 200 mg (T2) and 140 mg (T3), administered in a four-day, twice a day, decremental protocol, giving at the third day two PGF₂alfa doses. Cows were inseminated trice at 12, 24 and 36 h after detection of behavioral estrous. One week after estrous, cows were ultrasounded to assess corpora lutea numbers in each ovary and a blood sample was taken to measure serum P4 by RIA; after that, cows were transvaginally flushed to retrieve embryos. Responses evaluated were: Number of corpora lutea, ova retrieved (transferable embryos, degenerated embryos and non fertilized ova), transferable embryos, degenerated embryos, non fertilized ova, serum Progesterone, fertilization rate, ovarian volume, retrieval efficiency and percentage of superovulations with no production of transferable embryos. The statistical model included the fixed effects of treatment (T1, T2 and T3), animal (6 on experiment 2 and 12 on experiment 1) and period (three periods). Each experimental unit was allocated to a different treatment in each of three superovulations, in a simple, balanced crossover experimental design. The data were analyzed using the GLM procedure of SAS. The cows shown good response to superovulation in terms of total ova retrieved, but with a low fertilization rate; in opposition, the heifers had low response, but better fertilization rate. There were no differences in the three doses evaluated, and overall, the transferable embryo production was low compared with results obtained in modern, high productive breeds, but being similar to responses obtained with locally adapted breeds from other regions in the world. Based on these results, any of the three doses evaluated can be used with animals in the same age ranges, expecting similar results, with the advantage of the minor cost using reduced doses.

Key words: Cattle, Superovulation, Transferable embryos, Criollo, Coreño.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1. El papel de las razas nativas y localmente adaptadas de bovinos en la producción animal.....	4
1.1. Productividad animal y su interacción con el medio ambiente.	4
1.1.1. Cambio Climático y adaptación animal.....	4
1.1.2. Bovinos adaptados a medios ambientes adversos.	6
1.1.3. Programa mundial de rescate de recursos zoogenéticos.....	6
1.2. Algunas razas criollas y algunas de sus características reproductivas, productivas y fenotípicas alrededor del mundo.	7
1.2.1. Alberes.....	7
1.2.2. Uriu.....	7
1.2.3. Kenana.....	8
1.2.4. Cachena.....	8
1.2.5. Ankole.....	9
1.2.6. Criollo Colombiano Costeño con cuernos.....	9
1.2.7. Curraleiro.....	9
1.2.8. Blanco Orejinegro.....	10
1.2.9. Romosinuano.....	10
1.3. Bovinos criollos en México.....	11
1.3.1. Tipos de bovinos criollos en México.....	11
1.3.2. Los criollos mexicanos en programas de cruzamiento.....	12
1.3.3. Poblaciones criollas en México.....	12
1.3.4. Comportamiento reproductivo del criollo mexicano.....	13

1.3.4.1. Tiempo de Ovulación en la raza criollo Mexicano.	13
1.3.4.2. Duración del ciclo estral, diámetro de folículos y oleadas de desarrollo folicular en la raza criollo Mexicano.	14
1.3.4.3. Folículos reclutados por oleada en la raza criollo Mexicano.	14
1.3.4.4. Concentración de progesterona (P4) en la raza criollo Mexicano durante la fase lútea.	14
1.3.5. Protocolos de sincronización del estro en la raza Criollo Mexicano.	14
1.3.5.1. Protocolos de sincronización del estro con amamantamiento restringido en la raza criollo Mexicano.	15
1.3.5.2. Comparación de la sincronización de estro entre la raza criollo Mexicano y una raza europea de alta productividad.	15
1.3.5.3. Protocolos de sincronización del estro que incluyen el control de la ovulación en la raza criollo Mexicano.	16
1.3.5.4. Comparación del desempeño reproductivo de las razas criollo Mexicano, Guzerat y sus cruzas.	17
1.4. Conservación de los bovinos criollo en México.	17
2. La superovulación (SO) y la transferencia de embriones (TE), como herramientas para la conservación de recursos zoogenéticos.	18
2.1. Historia de la transferencia de embriones.	19
2.2. Aplicaciones de la transferencia de embriones.	19
2.3. Ventajas de la transferencia de embriones.	20
2.3.1. Mejoramiento genético.	20
2.3.2. Exportación e importación de embriones.	20
2.3.3. Control de enfermedades.	20
2.3.4. Mejoramiento de la fertilidad.	21

2.4. Desventajas de la transferencia de embriones.....	21
2.4.1. Costos de operación.....	21
2.4.2. Falla en la predicción de resultados.....	23
2.5. Factores que influyen en la respuesta a la superovulación.	23
2.5.1. Fase del ciclo estral.	23
2.5.2. Momento del inicio de los protocolos de superovulación.	24
2.5.3. Persistencia del folículo dominante.	24
2.5.4. Edad de la donadora.	25
2.5.5. Raza de la donadora.	25
2.5.5.1. Aparición de oleadas de desarrollo folicular.....	26
2.5.5.2. Reclutamiento de folículos.	26
2.5.5.3. Otras diferencias entre <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>	26
2.5.5.4. Diferencias entre razas <i>Bos taurus</i>	27
2.5.6. Fuente de gonadotropina.	27
2.6. Efecto de estado fisiológico y función zootécnica sobre la producción embrionaria.	28
3. Ciclo estral en el bovino.	30
4. Ovogénesis y maduración del ovocito.	31
4.1. Maduración nuclear de ovocitos.....	32
4.2. Maduración citoplasmática de ovocitos.....	33
4.2.1. Distribución mitocondrial.....	33
4.2.2. Actividad de ribosomas y RNA en maduración de ovocitos.....	34
4.2.3. Función del retículo endoplasmático en la maduración de ovocitos.	34
4.2.4. Gránulos corticales y reacción cortical.	35

4.2.5. Cambios en citoesqueleto durante la maduración de ovocitos...	35
4.2.6. Cambios moleculares durante la maduración de ovocitos.....	36
5. Desarrollo folicular.....	37
5.1. Reclutamiento.....	38
5.2. Selección.....	39
5.3. Dominancia.....	39
6. FSH Consideraciones generales de uso.	43
6.1. Dosis de FSH.	43
6.2. Dosis reducidas de FSH en protocolos de Superovulación.....	44
6.2.1. Dosis reducidas de FSH en ganado Bos indicus.....	44
6.2.2. Uso de dosis reducidas de FSH en ganado criollo lechero tropical Mexicano.....	44
6.2.3. Uso de dosis reducidas de FSH en ganado nativo cruzado.....	45
6.2.4. Uso de dosis reducidas de FSH en donadoras nativas en Corea.	45
6.2.5. Uso de dosis reducidas de FSH en ganado nativo de Japón.....	45
6.2.6. Uso de dosis reducidas de FSH en donadoras Sistani.....	46
6.2.7. Uso de dosis reducidas de FSH en criollos Colombianos.	46
6.2.8. Uso de dosis reducidas de FSH, en donadoras de raza compuesta que incluye ganado criollo Tailandés.....	46
6.3. Variantes en los protocolos de superovulación.....	47
6.3.1. Programa de reciclado rápido de donadoras. (DQTA).....	47
6.3.2. Sincronización de la oleada de desarrollo folicular.....	47
6.3.3. Variantes en la duración de dispositivos intravaginales de progesterona. (P4)	48

6.3.4. GnRH y LH como inductores de la ovulación.....	49
6.3.5. Protocolos actuales de superovulación.....	49
7. El estrés calórico como factor que impacta de manera negativa el desempeño reproductivo en los bovinos.....	50
7.1. Susceptibilidad al estrés calórico entre razas de bovinos.	51
III. JUSTIFICACIÓN.	53
IV. OBJETIVO	54
V. HIPOTESIS.	55
VI. MATERIALES Y METODOS.....	56
1. Localización.	56
2. Etapas de la fase experimental.....	56
3. Evaluación y selección de donadoras de raza criollo para programa de superovulación.	56
4. Manejo de los animales experimentales.....	58
4.1. Evaluación de condición corporal.	58
5. Sincronización y superovulación de las donadoras.	58
6. Reciclado rápido de donadoras.	59
7. Inseminación artificial de las donadoras.....	63
8. Mediciones de variables antes de la colección de embriones.	63
9. Procedimientos previos a la colección de embriones.	63
10. Medio usado para la colección de embriones.....	64
11. Colección embrionaria.	64
12. Búsqueda y evaluación de embriones.....	64
13. Criopreservación de embriones con fines de conservación de recursos genéticos.....	65

14. Diseño experimental.....	66
15. Variables de respuesta.....	66
16. Transformaciones de datos.....	67
17. Orden y asignación de tratamientos a unidades experimentales.	68
VII. RESULTADOS.....	71
VIII. DISCUSION.....	80
IX. CONCLUSIONES.....	89
X. LITERATURA CITADA.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de superovulación en vacas de la raza criollo.....	61
Tabla 2. Asignación de tratamientos 1, 2, y 3 durante los periodos I, II, y III a las unidades experimentales (vacas).....	69
Tabla 3. Asignación de tratamientos 1, 2, y 3 durante los periodos I, II, y III a las unidades experimentales (vaquillas).....	70
Tabla 4. Medias de cuadrados mínimos, error estándar y porcentajes de animales que al menos produjeron 1 embrión transferible para cada tratamiento en experimento con vacas.....	73
Tabla 5. Medias de cuadrados mínimos, error estándar y porcentajes de animales que al menos produjeron 1 embrión transferible para cada periodo en experimento con vacas.....	74
Tabla 6. Rangos en las medias de cuadrados mínimos y error estándar en el efecto vaca, en las variables evaluadas.....	75
Tabla 7. Medias de cuadrados mínimos, error estándar y porcentajes de animales que al menos produjeron 1 embrión transferible para cada tratamiento en experimento con vaquillas.....	77
Tabla 8. Medias de cuadrados mínimos y error estándar para cada periodo en vaquillas.....	78
Tabla 9. Rangos en las medias de cuadrados mínimos y error estándar en el efecto vaquilla, en las variables evaluadas.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias en tasa de preñez entre vacas inseminadas y vacas con embrión transferido en diferentes climas (Rodríguez <i>et al.</i> , 2004).....	22
Figura 2. Esquema de oleadas de desarrollo folicular en el bovino (Adams <i>et al.</i> , 2008).....	42
Figura 3. Protocolo de sincronización de oleada, superovulación y colección de embriones en vacas de la raza criollo. DIV=Dispositivo Intra-Vaginal con progesterona.....	60
Figura 4. Protocolo de reciclado rápido de donadoras utilizado en vacas de la raza Criollo.....	62

I. INTRODUCCIÓN

El potencial de reproducción de la hembra bovina es muy limitado, si se compara con la capacidad de producir descendencia del macho. La hembra produce a lo máximo una cría al año y en promedio 8 crías en su vida productiva (ganado de carne tipo europeo), en tanto que el macho es capaz de preñar cientos de hembras en un solo año.

Al liberar un solo ovocito en cada ciclo estral, la hembra solo le da uso a una mínima parte de los ovocitos competentes presentes en sus ovarios, aprovechando por ende un mínimo de su potencial genético.

La superovulación y la transferencia de embriones (TE) en ganado bovino son biotecnologías reproductivas que permiten incrementar el número de crías de una vaca donadora en un tiempo determinado (Stroud *et al.*, 2006). Una aplicación importante de estas biotecnologías es que las hembras con mérito genético sobresaliente puedan mejorar su tasa de reproducción. Un factor fundamental para el éxito de la TE es el desarrollo de protocolos de superovulación adecuados a la raza de la donadora (Baruselli *et al.*, 2006).

Cabe señalar que la necesidad de utilizar variantes en los protocolos de superovulación obedece a las diferencias fisiológicas que existen entre las razas de las hembras donadoras (Sartori y Barros 2011).

Los bovinos Criollos son descendientes de los hatos llegados a México provenientes de la península ibérica durante la conquista; son conocidos genéricamente en nuestro país como animales criollos y se consideran un recurso genético valioso por su capacidad de producir en condiciones difíciles de ambiente y alimentación, resultado de 5 siglos de adaptación a condiciones locales adversas, donde se han desarrollado.

Con la introducción de genotipos *Bos indicus* y razas británicas *Bos taurus* y la reciente introducción de razas *Bos taurus* de la Europa continental, las poblaciones de animales criollos se han visto paulatinamente desplazadas, al grado de que en la actualidad se identifican poblaciones pequeñas, aisladas en regiones distantes unas de otras en lugares agrestes, poco comunicados y fuertemente asociados a grupos étnicos (De Alba, 2011).

El ganado criollo es actualmente una raza con estatus de amenaza en México y por ello requiere que se apliquen estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*. Dentro de esta última, la conservación de gametos y embriones juega un papel relevante (SAGARPA, 2012).

Las razas localmente adaptadas son animales de talla pequeña, de bajos insumos y de función zootécnica no demandante, las cuáles pueden ser superovuladas con cantidades menores de FSH y lograr respuestas satisfactorias (Son *et al.*, 2007, Quaresma *et al.*, 2003, Lopes de costa *et al.*, 2001, Barati *et al.*, 2006), y con esto obtener embriones para programas de rescate de este valioso germoplasma.

En la literatura se encuentran diversos estudios, que reportan que el uso de dosis reducidas de FSH, en bovinos criollos, pueden producir una respuesta superovulatoria similar a la que se obtiene con dosis convencionales, por ejemplo; en animales Criollo tropical lechero se utilizaron dosis de 260 y 210 mg, sin encontrar diferencias en la producción de embriones transferibles entre las 2 dosis (3.2 ± 0.7 vs 3.0 ± 0.8) (Rosales, 2013). Otro estudio comparó dosis de 360 mg y 260 mg, en animales cruzados con genotipos nativos, sin encontrar diferencias en la producción de embriones transferibles (4.2 ± 0.7 vs 4.3 ± 0.6) (Sumretprasong *et al.*, 2008). Trabajos con dosis reducidas de preparaciones de FSH crudas, en animales nativos, reportan resultados similares. En Colombia un estudio con razas nativas, donde se compararon dosis de 36 mg y 24 mg de FSH, no se encontraron diferencias en la producción de embriones transferibles (1.4 ± 0.81 vs 1.43 ± 0.96) (Estrada *et al.*, 1998).

El presente estudio se realizó con el objetivo de conocer la respuesta a la superovulación de vacas de la raza Criollo Coreño, a tres dosis reducidas de FSH y que esta información aporte conocimiento en favor de programas de rescate genético de éste genotipo. Como ya se menciona en México la citada raza se encuentra en estatus de amenaza y corre el riesgo de ser absorbida por otras razas de reciente introducción ó desaparecer por considerarla improductiva. Sin embargo, existe información científica que ha demostrado que tiene valor potencial al ser incluida en programas de cruzamiento (Martinez et al., 2006). Además, esta raza tiene una gran importancia socioeconómica para los grupos de ganaderos que las explotan (De Alba, 2011). La raza de bovinos Criollo Coreño son animales de talla pequeña y de función zootecnica no demandante, por lo tanto se plantea que se pueda producir una respuesta satisfactoria a la superovulación con dosis reducidas de FSH.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

1. El papel de las razas nativas y localmente adaptadas de bovinos en la producción animal.

Las razas criollas son poblaciones de animales que, aunque no son originarios de un lugar, han permanecido en él por un número elevado de generaciones y se han adaptado a las condiciones locales donde son explotados. La mayoría de los animales locales se encuentran en zonas de difícil acceso y con condiciones adversas para la producción animal. Generalmente son consideradas de baja producción y han sido desplazadas por razas modernas de mayor productividad. Sin embargo, estas razas presentan una excelente adaptación a climas extremos, buena resistencia a enfermedades parasitarias, gran rusticidad y resiliencia, lo cual los vuelve atractivos a ser incluidos en programas de cruzamientos. Además de que son un pilar importante en la economía de las zonas donde son explotados y en algunos casos son importantes desde el punto de vista social y cultural en los pueblos que crían dichos animales (De Alba, 2011).

1.1. Productividad animal y su interacción con el medio ambiente.

1.1.1. Cambio Climático y adaptación animal.

Recientemente se han reportado cambios en las constantes climáticas alrededor del mundo. Dichos cambios pueden alterar la homeostasis de los animales que tienen como función zotécnica la producción de alimentos para consumo humano, esto causa problemas en la rentabilidad de los sistemas de producción y por ende en el abasto y precio de los alimentos (Aggarwal y Upadhyay 2013).

Al salir de homeostasis, los animales activan distintos mecanismos fisiológicos compensatorios para regresar a dicha condición, la activación de estos mecanismos da como resultado una disminución en la productividad y puede llegar a tener efectos fatales en los animales (Rhoads *et al.*, 2010). En la mayoría de los animales domésticos, existen parámetros climáticos que son considerados

como óptimos. Existe un rango alrededor estos parámetros, que es conocido como zona de confort (Aggarwal y Upadhyay 2013).

Las condiciones ambientales bajo las cuales los animales domésticos producen alrededor del mundo, son muy variables y se reflejan en diferentes niveles de productividad y rentabilidad (St-Pierre *et al.*, 2003). En general, es más difícil y limitado manifestar un comportamiento productivo sobresaliente en climas cálidos que en ambientes templados y fríos. Por ende, los animales que se desarrollan en climas cálidos, presentan características deseables en programas de cruzamiento como: mayor resistencia a enfermedades, capacidad de sobrevivir con menor cantidad de insumos y en general una mayor rusticidad que los animales de climas fríos (Aggarwal y Upadhyay 2013).

En el caso de los bovinos, se pueden encontrar una gran variedad de razas alrededor del mundo con distintos grados de adaptación a los diferentes ecosistemas (Scherf y Tixier 2009). Las razas que se han adaptado a climas cálidos, presentan una menor productividad, pero tienen gran importancia en las comunidades donde se explotan, mantienen activa la economía, forman parte de la cultura y tradición de la población. Además de esto, son recursos genéticos valiosos que pueden ser incluidos en programas de cruzamientos (Martínez *et al.*, 2008).

Se han desarrollado razas de bovinos que presentan niveles de producción mayores a los que manifiestan sus antecesores de la misma especie, estas razas generalmente han sido desplegadas en climas templados o fríos. Al ser animales más productivos son demandados alrededor del mundo para explotarlos o para incluirlos en programas de cruzamientos. Esto ha ocasionado que los animales nativos alrededor del mundo sean relegados o absorbidos por estas razas de reciente introducción (Pilling 2010). Las razas más productivas, también requieren una cantidad mayor de insumos para lograr dicha productividad, y al ser razas introducidas a nuevos ecosistemas, en ciertas circunstancias presentan una pobre

capacidad de adaptación al medio ambiente donde son introducidas; son animales con una capacidad limitada de hacer frente a las variables climáticas, por lo cual es necesario que se realicen cruces con aquellos animales que pueden hacer frente a dichos cambios o que ya se encuentren adaptados (John *et al.*, 2010).

1.1.2. Bovinos adaptados a medios ambientes adversos.

Alrededor del mundo existen razas de ganado bovino, que se encuentran bien adaptadas a diferentes ecosistemas, estas razas son conocidas como; razas locales, autóctonas o criollas. Muchas de ellas no son originarias de esos lugares, sin embargo, llevan ahí bastante tiempo y con esto han logrado adaptarse a ese medio ambiente (De Alba 2011).

Las razas Criollo de bovino son importantes para la economía y cultura de las zonas donde se explotan. En general, la literatura que refiere a los bovinos criollos, coincide en que son animales bien adaptados, que aprovechan al máximo recursos alimenticios de la zona donde se encuentren, incluso cuando estos recursos no son los de la más alta calidad (Fina *et al.*, 2008).

Los bovinos criollos pueden ser utilizados en programas de cruzamiento, en donde se pueden aprovechar las características más importantes de ambas razas involucradas en el cruzamiento. Por lo que corresponde a la aportación del criollo: la resistencia a enfermedades parasitarias, buena adaptación a climas adversos y aceptable producción con bajos insumos (Martínez *et al.*, 2008).

1.1.3. Programa mundial de rescate de recursos zoogenéticos.

La FAO ha exhortado a todos los países que cuenten con razas criollas a conservarlas como parte de la preservación de la diversidad genética de cada zona o país. En diferentes países se han iniciado programas de conservación de este genotipo como parte del programa mundial de acción para el rescate de recursos zoogenéticos. Se vislumbra a estas razas como una posible solución a la limitada diversidad genética con la que cuentan las razas puras de alta

producción, de cara a los retos climáticos que se han presentado en años recientes y que habrán de agudizarse en el futuro inmediato (Hoffmann y Scherf 2010).

1.2. Algunas razas criollas y algunas de sus características reproductivas, productivas y fenotípicas alrededor del mundo.

1.2.1. Alberes.

Los bovinos Alberes en el Noreste de España, presentan una buena resistencia a enfermedades y una excelente adaptación para aprovechar recursos alimenticios de la zona donde se explotan. Son animales de talla pequeña y de baja productividad. La edad al primer parto de esta raza tiene un rango entre 3 y 4 años. El uso de la inseminación artificial y otras herramientas reproductivas en esta raza es nula (Fina *et al.*, 2008). Los parámetros, reproductivos de esta raza, están por debajo de los parámetros de bovinos *Bos taurus*; de hecho, son más similares a los de algunas razas *Bos indicus* (Sartori y Barros 2011), sin embargo, son valiosos por sus características de rusticidad e importantes en la economía de la zona donde son explotados (Fina *et al.*, 2008).

1.2.2. Uriu.

En Vietnam se explota la raza de ganado Uriu, que pertenece a la familia de los bóvidos. Este ganado ha sido seleccionado naturalmente y adaptado a las condiciones de la región donde se desarrolla. En esta región existen rangos de temperatura que varían de los 6 a los 42°C y con rangos de humedad que van del 31% a 86%. En la zona donde se encuentra este ganado es muy difícil la introducción de vehículos, por lo tanto éstos animales son utilizados para realizar tareas de tracción y carga. Las hembras se utilizan como pie de cría y la leche que producen solo se utiliza para amamantar a su cría. Tanto machos como hembras cuando culminan su etapa productiva son utilizados para abastecer de carne a sus propietarios. Estos bovinos alcanzan su madurez sexual entre los 18 y 20 meses, se gestan en promedio entre los 22 y 24 meses, tienen su primer parto entre los

33 y 34 meses en promedio y un intervalo entre partos de 14 a 32 meses (Dong Xuan *et al.*, 2006).

1.2.3. Kenana.

La raza criolla Kenana, pertenece a la sub especie *Bos indicus*, son animales de talla pequeña, en donde los machos llegan a pesar entre 300 a 500 kg y las hembras de 250 a 300 kg. Son de las principales razas productoras de leche en Sudán, la producción de leche varía de 1400 kg a 2100 kg por lactancia que dura de 198 a 257 días, obteniendo su máxima productividad hasta los 7 u 8 años de edad. El promedio de edad al primer parto de esta raza es a los 57 ± 16 meses y el intervalo entre partos es de 467 ± 133 días (Yousif *et al.*, 2006). Esta raza a pesar de pertenecer a la especie *Bos indicus*, presentan en promedio intervalos entre partos e inicio de vida productiva más prolongados y retrasados que otras razas de la misma especie como Brahman o Nelore. Cabe mencionar que en la raza Kenana no se aplican herramientas reproductivas de mejoramiento genético y posiblemente por eso no han modificado dichos parámetros, a diferencia de Brahman y Nelore, que son las razas donde más se ha realizado selección de características que permiten mejorar los parámetros reproductivos y que aunque son menos eficientes que los *Bos taurus* no tienen intervalos tan prolongados como en esta raza nativa (Sartori y Barros 2011).

1.2.4. Cachena.

Es esta una raza autóctona que se localiza en el Noreste de Portugal; se caracteriza por su adaptación a condiciones ambientales adversas y baja productividad. Estos animales son de talla extremadamente pequeña, los machos adultos pesan en promedio 288 ± 2.2 kg y 255 ± 5.3 kg las hembras. Son utilizados principalmente como animales de trabajo, para cumplir labores en la agricultura. Inician actividad reproductiva aproximadamente a los 24 meses de edad y tienen su primer parto alrededor de los 36 meses, con intervalos entre partos de 18 meses (Brito *et al.*, 2005). El comportamiento reproductivo de ésta raza autóctona

es similar al que se encuentra en animales *Bos indicus* en los que se ha hecho selección genética (Álvarez *et al.*, 2000).

1.2.5. Ankole.

En Uganda se encuentra la raza local Ankole, que se caracteriza por la adaptación y tolerancia a la sequía, al calor, a enfermedades y por su habilidad para alimentarse con recursos forrajeros de baja calidad nutricional. La tasa de supervivencia de las crías de esta raza se estima cerca del 90%. Esta raza produce en promedio 2.2 ± 0.1 kg de leche al día. En esta raza la edad a la pubertad es de 23.6 ± 0.5 meses para machos y 22.7 ± 0.5 meses para las hembras. La edad al primer parto fue de 33.5 ± 0.5 meses y con un intervalo entre partos de 12.9 ± 0.8 meses (Kugonza *et al.*, 2011).

1.2.6. Criollo Colombiano Costeño con cuernos.

En Colombia existen varias razas criollas, una de ellas es la conocida como criollo Colombiano Costeño con cuernos. Esta raza se adapta a condiciones extremas; que van de zonas húmedas, hasta zonas áridas. Son animales de talla mediana, en donde los machos llegan a pesar entre 532 y 690 kg y las hembras entre 380 y 450 kg. La producción de leche en promedio de esta raza es de 2.2 kg por día. La edad al primer parto en esta raza se promedia a los 37.6 meses de edad, con un intervalo entre partos de 14.7 meses. Son animales longevos y con una tasa de natalidad de 74.5%. En un periodo de 14 años la tasa de mortalidad de terneros y animales adultos fue de 5.6% (Ossa *et al.*, 2011).

1.2.7. Curraleiro.

La población de bovinos en Brasil, está compuesta principalmente de animales *Bos indicus* (Barros y Nogueira 2001), sin embargo, existen bovinos criollos locales que pertenecen a la sub-especie *Bos taurus*. Una de ellas es la conocida como Curraleiro. Esta raza se han adaptado a forrajes de baja calidad nutricional, altas temperaturas, clima seco y otras condiciones características del interior de

Brasil, además, son animales sumamente dóciles, tiene buenos rendimientos en canal, producen carne y leche de buena calidad. En cuanto a parámetros reproductivos, el primer servicio de las hembras se promedia entre los 2 y 2.5 años de edad, teniendo su primer parto entre los 3 y 3.5 años. Estos animales son comercializados como animales de tracción para fiestas religiosas y eventos culturales. A pesar de presentar una baja productividad, los propietarios de éstas razas se sienten satisfechos con la rusticidad y los bajos costos de producción de estos animales (Soares *et al.*, 2011).

1.2.8. Blanco Orejinegro.

La raza Blanco Orejinegro (BON), se encuentra principalmente en Colombia. Es una raza que se ha adaptado a terrenos abruptos y muy inclinados. Presentan excelente resistencia a parásitos. Inicialmente esta raza se utilizó como animal de carga de sacos de café. La longitud de la gestación en esta raza es en promedio de 283 días, es similar a la mayoría de *Bos taurus* (279.6 en machos y 278.4 en hembras) (Tubman *et al.*, 2004). Presentan tasa de supervivencia al destete del 93% a 270 días. Datos de esta raza mencionan que existen tasas de preñez de 48 % en vacas lactando, 90.5% en vacas secas y 82.4% en vaquillas. El promedio de edad a primer parto es de 40.9 meses y el intervalo entre partos de 379 días (De Alba, 2011).

1.2.9. Romosinuano.

La Romosinuano es una raza criolla colombiana de la que se conoce una buena fertilidad y longevidad, teniendo reportes de tener hasta 10 partos en años consecutivos. Esta raza es más precoz que la mayoría de las razas criollas de Colombia. El promedio de edad a quedar gestante es entre los 12 y 16 meses de edad. El intervalo entre partos para esta raza se ha estimado entre 370 y 395 días. En México existen algunos hatos de Romosinuano y se encuentran registrados en la Asociación Mexicana de Criadores de Romosinuano y Criollo Lechero Tropical (AMCROLET), dicha asociación de se ha dado a la tarea de realizar rescate y

evaluaciones genéticas (De Alba, 2011). Los parámetros reproductivos de esta raza son similares a la que presenta el ganado Angus (*Bos taurus*) en trópico (Álvarez *et al.*, 2000).

1.3. Bovinos criollos en México.

En México existen diferentes núcleos de bovinos criollos, estos núcleos se encuentran en zonas aisladas, agrestes, poco comunicadas y de difícil acceso; son zonas donde por lo general habitan pueblos indígenas (De Alba, 2011).

Los bovinos criollos que se encuentran en México son descendientes de los hatos llegados con los españoles, provenientes de la península ibérica, se estima que derivan de las razas: Retinta Andalucía, Rubia Gallega, Murcia Sanabranesa, entre otras (Quezada *et al.*, 2014). Este ganado es en general considerado como de baja producción o improductivo; sin embargo, es también un recurso genético valioso por su capacidad de producir en condiciones difíciles de ambiente y alimentación, esto como resultado de más de 5 siglos de adaptación a las zonas donde es explotado (Martínez, 2005; De Alba, 2011).

1.3.1. Tipos de bovinos criollos en México.

Actualmente en nuestro país se identifican diferentes tipos de ganado criollo, aunque presentan pequeñas diferencias fenotípicas, la gran mayoría conservan características morfológicas similares. Entre las líneas que se pueden identificar, se encuentra el Criollo de Rodeo o Rarámuri en Chihuahua, el Chinampo en Baja California sur, El Criollo de Oaxaca y Guerrero, el Canelo de los Altos de Jalisco, el corriente de Tamaulipas y el Criollo Coreño de Nayarit (ASOCRIOLLO 2010).

Estas y otras líneas de bovinos criollo, fueron prevalentes por más de tres siglos desde su introducción; sin embargo, a partir de la segunda mitad del siglo XIX empezaron a sufrir desplazamiento por parte de genotipos *Bos indicus* y *Bos taurus* de reciente introducción, al considerarse de manera generalizada que estos animales presentaban mejores características que los criollos. Este

desplazamiento se dio a través de cruzamientos absorbentes entre los tipos de Criollo y las nuevas razas (Martínez, 2005).

1.3.2. Los criollos mexicanos en programas de cruzamiento.

Los recursos genéticos locales, son importantes para la economía, la cultura y el desarrollo de las zonas donde son explotados. Estos animales en general presentan excelente rusticidad y adaptación a climas, recursos forrajeros y manejo subóptimo, lo que los hará atractivos en programas de cruzamiento, donde podría eventualmente ser necesario incluir diversidad genética para hacer frente a los cambios climáticos que están ocurriendo alrededor del mundo.

Existe información que resalta la importancia del uso de recursos genéticos locales en programas de mejoramiento y producción de carne. Un estudio publicado por Martínez *et al.*, (2006), muestra que animales criollo, tuvieron menores pesos al inicio del periodo de engorda y menores pesos finales; sin embargo, presentaron ganancias de peso aceptables y una eficiencia de conversión alimenticia mayor que algunas cruzas; además, las cruzas de criollo con Guzerat, fueron mas pesadas que los animales de raza pura. Martínez y colaboradores en 2008, encontraron que las crías producto de las cruzas de criollo con Guzerat, presentaron mayores pesos al nacimiento y destete comparadas con las razas puras, los resultados publicados en estos trabajos indican que los bovinos criollo pueden ser incluidos en programas de cruzamiento con resultados favorables (Martínez *et al.*, 2008).

1.3.3. Poblaciones criollas en México.

Los únicos datos publicados disponibles indican que en Chihuahua en el 2006 se estimó una población total de bovinos criollo de 157,122 cabezas (ASOCRIOLLO 2010), por otro lado, en Nayarit en el 2005 se estimó una población de 16,360 cabezas (Martínez, 2005). Se tiene reporte de presencia de hatos criollos en Tamaulipas, Baja California Sur, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, pero no se cuenta con información de inventarios (De Alba, 2011). El hato nacional de esta raza ha

disminuido de manera considerable y tiende a desaparecer por considerarlo de manera errónea improductivo.

1.3.4. Comportamiento reproductivo del criollo mexicano.

Se ha reportado que las vacas criollo en México, presentan sus pariciones a finales de la primavera e inicio de verano, el rango para el primer parto es entre los 36 y 48 meses de edad, teniendo intervalos interparto de 20 meses (ASOCRIOLLO, 2010).

Las tasas de preñez de la raza criollo cuando son sometidas a protocolos de sincronización, generalmente son más bajas que las que presentan otras razas *Bos taurus*. Estos datos parecen indicar, que los bovinos criollo, son animales menos eficientes en desempeño reproductivo que otras razas, sin embargo, como se mencionó anteriormente, existen diferencias entre razas y este biotipo tiene sus características propias que hacen necesarias adecuaciones en los protocolos para obtener resultados favorables (Quezada *et al.*, 2014).

1.3.4.1. Tiempo de Ovulación en la raza criollo Mexicano.

En un estudio se sincronizaron con prostaglandinas 30 vacas criollo, de las cuales 22 (73.3%) manifestaron signos de estro y ovularon. La ovulación se presentó a las 46.2 ± 8.2 h después de iniciado el estro en las hembras que no fueron sincronizadas, y en las sincronizadas fue 37.6 ± 6.0 h ($P < 0.01$) (Quezada *et al.*, 2014). Esto difiere de otras razas tanto en sub-especie *Bos taurus* y *Bos indicus* mostrando que la raza criollo tarda más en presentar la ovulación ya sea de manera natural o sincronizada. En vacas Holstein (*Bos taurus*), se determinó que la ovulación ocurrió a las 27.6 ± 5.4 h, después de la primer monta detectada (Walker *et al.*, 1996). En ganado Cebú del este de África (*Bos indicus*), se encontró que la ovulación ocurrió a las 25.82 ± 5.25 h, después de iniciado el estro (Mattoni *et al.*, 1988).

1.3.4.2. Duración del ciclo estral, diámetro de folículos y oleadas de desarrollo folicular en la raza criollo Mexicano.

En el estudio de Quezada (2014) referido en el párrafo anterior, se encontró que el 22.7% de las hembras mostraron 3 oleadas foliculares, mientras que el 77.3% mostraron 2 oleadas foliculares. En promedio el ciclo estral de esta raza dura 21.1 ± 1.2 días. El diámetro máximo de los folículos preovulatorios fue de 10.0 ± 1.0 mm (Quezada *et al.*, 2014), similar a lo encontrado en animales *Bos indicus* (10 a 12 mm) y menor a lo encontrado en animales *Bos taurus* (14 a 20 mm) (Figueiredo *et al.*, 1997).

1.3.4.3. Folículos reclutados por oleada en la raza criollo Mexicano.

Quezada (2014) reporta que se detectaron 8.5 ± 1.7 folículos reclutados por oleada, cantidad muy por debajo a lo encontrado en otras razas tanto *Bos taurus* como *Bos indicus*. Se ha publicado que en hembras de raza *Bos taurus* se reclutan por oleada entre 30 y 20 folículos (Álvarez *et al.*, 2000), mientras que pueden llegar a reclutarse hasta 50 por oleada en las *Bos indicus* (Buratini *et al.*, 2000).

1.3.4.4. Concentración de progesterona (P4) en la raza criollo Mexicano durante la fase lútea.

La cantidad de P4 circulante que se reporta en estudios con la raza Criollo va de 4.77 ± 0.68 ng/ml (Zarate, 2008) a 6.5 ± 0.6 ng/ml (Quezada *et al.*, 2014). Cantidades similares a las encontradas en otras razas *Bos taurus*, 5.8 ± 0.2 ng/ml (Mateos *et al.*, 2002)

1.3.5. Protocolos de sincronización del estro en la raza Criollo Mexicano.

En un estudio realizado en 2008, se sincronizaron a hembras de la raza Criollo con dispositivos intravaginales de P4, encontrando que 75% de las hembras mostraron estro a las 42.3 ± 0.71 horas después de retirado el dispositivo, tiempo similar a lo que encontró Quezada (2014)

Este estudio indica que el uso de dispositivos intravaginales con P4 en vacas Criollo, resulta en mejores tasas de estro, a diferencia de otro estudio donde vacas criollo sincronizadas con un implante subcutáneo de norgestomet, una análogo sintético de progesterona presentaron formación de folículos anovulatorios y bajas tasas de expresión de celo (Zárate, 2008).

1.3.5.1. Protocolos de sincronización del estro con amamantamiento restringido en la raza criollo Mexicano.

En un segundo experimento de Zárate (2008), se evaluó el comportamiento reproductivo de vacas criollo con amamantamiento restringido y su respuesta a la sincronización del estro, utilizando protocolos que incluían estradiol y dispositivos intravaginales con P4. Se encontró que de los animales que fueron sometidos a amamantamiento restringido; el 81.48% ovularon corroborándolo con las mediciones séricas de P4 varios días después ($>1\text{ng/ml}$) y sólo el 11.11% presentó signos de celo. La tasa de gestación en este trabajo fue de 18.8%, y se cree que este porcentaje bajo de gestación, se deba en gran parte a la distribución y agrupación de estros fuera de los rangos de tiempo establecidos para la inseminación (Zárate, 2008).

1.3.5.2. Comparación de la sincronización de estro entre la raza criollo Mexicano y una raza europea de alta productividad.

En un tercer experimento, Zárate comparó la actividad ovárica en respuesta a la sincronización de dos razas de la sub-especie *Bos taurus*. Las vacas criollo presentaron mayor incidencia de estros anovulatorios (62.5% vs 30%), que las vacas Hereford ($P<0.05$). El diámetro del folículo dominante fue menor en las vacas criollo que en las Hereford ($1.32\pm 0.086\text{ cm}$ vs $1.67\pm 0.077\text{cm}$) ($P<0.0.1$). Además, las vacas Criollo presentaron un lapso mayor de la última inyección de estrogénos a la presentación del estro, en comparación con las Hereford ($40.17\pm 1.064\text{h}$ vs $31.68\pm 0.952\text{h}$) ($P<0.05$). En cuanto la tasa de gestación, se obtuvo un 25% de gestación en las vacas Criollo, mientras que en las Hereford se

obtuvo un 60% ($P < 0.05$), se encontraron concentraciones altas de P4 durante la sincronización de las vacas criollo, pudiendo ser el motivo de la menor tasa de preñez; además, se cree que el menor diámetro del folículo ovulatorio que presentaron las criollo, influyó en la baja fertilidad (Zárate 2008).

Una alternativa para incrementar la tasa de concepción en bovinos, es el uso de protocolos hormonales que no solo sincronicen los estros, sino que también sincronicen las ovulaciones. Estos protocolos se han desarrollado gracias, al conocimiento de las oleadas de desarrollo folicular, permitiendo usar hormonas exógenas en tiempo y forma para lograr la sincronía de la ovulación, obteniendo tasas de gestación más altas que cuando se sincroniza solo el estro (Larson *et al.*, 2009).

1.3.5.3. Protocolos de sincronización del estro que incluyen el control de la ovulación en la raza criollo Mexicano.

El protocolo más conocido es el llamado OVSYNCH (Pursley *et al.*, 1995); este protocolo utiliza prostaglandinas y GnRH para realizar inseminaciones artificiales a tiempo fijo. De éste, se han generado variantes obedeciendo a las diferencias fisiológicas y zootécnicas entre razas de bovinos (Saldarriaga *et al.*, 2007). La combinación de los protocolos SYNCH y el uso de dispositivos intravaginales con P4, ha resultado en tasas de gestación $\geq 50\%$ en ganado *Bos indicus*, cuando se insemina a tiempo fijo (Larson *et al.*, 2004).

En vacas criollo se llevó a cabo un estudio, donde se evaluaron dos protocolos de sincronización de la ovulación, utilizando GnRH, eCG, prostaglandinas y dispositivos intravaginales de P4. La tasa de gestación para el protocolo 1 fue de 31.58% y para el 2, 46.67%, siendo los resultados de ambos tratamientos superiores a los encontrados por Zárate (25%). Los resultados muestran que las tasas de gestación en las vacas criollo son bajas, sin embargo, con el uso de GnRH y eCG en los protocolos, la tasa de gestación puede ser mejorada sustancialmente con respecto a trabajos previos (Sánchez *et al.*, 2013).

1.3.5.4. Comparación del desempeño reproductivo de las razas criollo Mexicano, Guzerat y sus cruzas.

Un estudio que evaluó los registros reproductivos de los años; 2000 al 2003, de las razas; Criollo Coreño (*Bos taurus*), Guzerat (*Bos indicus*) y sus cruzas recíprocas en el estado de Nayarit, México; muestra que los porcentajes de tasa de estro fueron mayores en las cruzas recíprocas de criollo y Guzerat (82 ± 17 y 75 ± 10) ($P\leq 0.10$); la raza criollo fue superior a la Guzerat en casi 20 puntos porcentuales ($69\pm 09\%$ vs $49\pm 13\%$) ($P\leq 0.10$). La tasa de gestación también fue superior para las cruzas (72 ± 16 y 64 ± 11) ($P\leq 0.10$), y de nuevo las vacas criollo superaron a las Guzerat, con casi 14 puntos porcentuales ($60\pm 09\%$ vs $46\pm 12\%$) ($P\leq 0.10$). Este estudio sugiere que las cruzas de estas razas, son una opción viable a considerar en la producción de carne en la región tropical de Nayarit (Martínez *et al.*, 2006^b).

Este estudio resalta también que las vacas criollo tuvieron ventaja sobre las Guzerat en parámetros reproductivos, lo cual no necesariamente indica que las vacas criollo son superiores a las *Bos indicus*; es posible que la raza Guzerat presente un desempeño reproductivo menor a otras razas *Bos indicus* (Brahman, Nelore) y también se aprecia que la raza Criollo Coreño de Nayarit, bajo las condiciones de este estudio, manifestó un desempeño superior al reportado por vacas criollo en los trabajos de Zárate (2008) y Sánchez *et al.*, (2013).

1.4. Conservación de los bovinos criollo en México.

Según el criterio de la FAO, la mayoría de los bovinos criollos, incluyendo los mexicanos, se encuentran en el status de amenaza y pueden llegar a desaparecer. Actualmente se han implementado estrategias de conservación y rescate de los recursos zoogenéticos importantes para la alimentación. Entre los puntos que contempla el plan global de acción está; la caracterización, inventario, monitoreo de amenazas, uso y desarrollo de los recursos genéticos y conservación (Hoffmann y Scherf 2010). Cabe mencionar que cuando se habla de

conservación, ésta implica preservación y utilización racional de los recursos genéticos (Martínez *et al.*, 2009).

La conservación de los recursos genéticos se debe realizar tanto *in situ* como *ex situ*. Dentro de esta última estrategia, la conservación *in vitro* de gametos y embriones juega un papel relevante. El gameto masculino (espermatozoide) es la principal fuente de germoplasma que compone los bancos de recursos genéticos animales; sin embargo, se deja de aprovechar el potencial genético de las hembras al no conservar sus gametos o embriones, que portan el material genético de ambos progenitores. (Hoffmann y Scherf, 2010).

2. La superovulación (SO) y la transferencia de embriones (TE), como herramientas para la conservación de recursos zoogenéticos.

La obtención de gametos femeninos es limitada en comparación con los de los machos. En una hembra de bovino, se obtiene un óvulo por ciclo estral y esto ocurre en promedio cada 21 días. Dentro del ovario existe una gran población de ovocitos viables, los cuáles pueden ser estimulados por medio de hormonas exógenas para acelerar su crecimiento y maduración. Para lograr esto se han desarrollado protocolos de SO o múltiples ovulaciones para programas de transferencia de embriones (MOET). Los protocolos de SO, utilizan hormonas exógenas, que alteran la dinámica folicular de las hembras donadoras para favorecer el desarrollo simultáneo de varios folículos ovulatorios. Para lograr lo anterior, se utilizan inyecciones individuales o múltiples de gonadotropina coriónica equina o extractos pituitarios, ya sea crudos o purificados (Mapletoft *et al.*, 2002).

La fertilización de los óvulos madurados liberados al oviducto, se realiza mediante la inseminación artificial, para que posteriormente, los embriones producidos sean colectados en etapas tempranas de desarrollo (Galli *et al.*, 2003). Los embriones después de la colecta son evaluados para determinar cuáles cumplen con los requisitos que establece la IETS para ser transferidos o criopreservados (IETS 2007).

Una de las ventajas más importantes que ofrece la tecnología de la transferencia de embriones (TE), es que permite incrementar el número de crías de una vaca donadora. Generalmente se utilizan como donadoras a aquellas hembras con mérito genético sobresaliente (Hasler, 2006).

2.1. Historia de la transferencia de embriones.

La manipulación de los primeros embriones se inició hace más de 100 años en conejas y en éstas fue donde se comenzó a estudiar sobre la importancia del ambiente materno y su influencia sobre el desarrollo de los embriones (Biggers, 1991). La transferencia comercial de embriones en bovinos se desarrolló a partir de los años 1950's (Mapletoft, 2013), teniendo su auge en los años 1970's y 80's con la introducción masiva de razas de la Europa continental al continente americano. En los últimos 30 años la aplicación de ésta tecnología ha ido en aumento especialmente en el ganado lechero, con más animales seleccionados por su genética que por un fenotipo deseable (Betteridge, 2003). Hoy en día se realizan miles de colecciones de embriones alrededor del mundo, lograndose transferir más de 500,000 embriones por año, de los cuáles el 53% fueron embriones congelados (IETS 2007 y Colazo y Mapletoft, 2007).

2.2. Aplicaciones de la transferencia de embriones.

La técnica de transferencia de embriones ha sido ampliamente usada en la investigación; y es usada actualmente en esquemas de producción comercial ya que es una herramienta importante para los programas de mejoramiento genético (Colazo y Mapletoft, 2007).

2.3. Ventajas de la transferencia de embriones.

2.3.1. Mejoramiento genético.

El uso de la transferencia de embriones ha demostrado de manera objetiva ser una herramienta muy útil para acelerar el mejoramiento genético en función de que aumenta la intensidad de selección en el lado materno y si se aplica en hembras prepúberes puede acortar el intervalo generacional, logrado con todo ello incrementar la tasa de ganancia genética anual, por ejemplo, de manera natural una hembra en el mejor de los casos llega a parir una cría por año, si fuese una vaca longeva, podría llegar a producir de 8 a 10 crías en su vida productiva, pero si es sometida al esquema de múltiples ovulaciones para programas de transferencia de embriones (MOET), de esa hembra se pueden obtener 2 a 3 preñeces por lavado, de 6 a 8 lavados al año, logrando producir de 12 a 24 crías por año y con esto aumentar la capacidad reproductora de vacas con alto mérito genético o élite (Hasler 2003).

2.3.2. Exportación e importación de embriones.

El transporte de semovientes de un hato a otro es muy costoso e implica riesgos para la salud de los animales. Cuando se pretenden realizar esos movimientos entre diferentes países resulta aún más riesgoso y costoso, además de las complicaciones que implican los trámites de movilización transfronteriza. Por el contrario, si se quisieran transportar embriones congelados, los costos bajan sustancialmente, ya que se pueden transportar cientos de embriones en un contenedor con nitrógeno líquido. Además, de disminuir costos, es de suma importancia destacar que con el comercio de embriones congelados disminuyen los riesgos de transmisión de enfermedades (Mapletoft, 2006).

2.3.3. Control de enfermedades.

Hasta donde se conoce, ninguna de las enfermedades estudiada en bovinos ha sido transmitida por embriones producidos *in vivo*. Si los embriones mantienen su

zona pelucida intacta y son lavados con enzimas proteolíticas sin que ésta se dañe, no transmiten enfermedades infecciosas. Por lo tanto la TE se podría utilizar para salvar algún genotipo valioso en el caso de pandemias incontrolables, además con esta herramienta se pueden establecer hatos libres de algunas enfermedades como la leucosis bovina. Actualmente algunos productores ya utilizan la TE para lograr hatos libres de enfermedades y los animales que se obtienen son utilizados para producción en el mismo hato. (Mapletoft, 2006).

2.3.4. Mejoramiento de la fertilidad.

La TE puede ser una alternativa para solucionar problemas en aquellas vacas que son repetidoras y que presenten problemas como: adherencias en el tracto reproductivo superior, oviductos bloqueados y ovarios quísticos (Hasler, 2003). Otros estudios han demostrado beneficios con el uso de la TE como alternativa a la Inseminación Artificial como método de preñar a las vacas, cuando éstas sufren de estrés calórico. En Brasil, se encontró un aumento del 20% en la tasa de preñez al preñar las vacas con embrión en lugar de inseminarlas, durante los meses de verano y otoño cuando la temperatura fue mayor a 22.5 °C (Figura N°1) (Rodríguez *et al.*, 2004).

2.4. Desventajas de la transferencia de embriones.

2.4.1. Costos de operación.

La técnica de TE representa costos muy altos debido a que utiliza mayor cantidad de hormonales para la superovulación y la sincronización de receptoras, representa costos por manejo el cuál debe ser realizado por una persona especializada para la superovulación y sincronización de receptoras, requiere de medios especiales para la colección de embriones, además del uso de crioprotectores y soluciones para la manipulación de los embriones. Existe un costo durante la obtención de los embriones, debido a que es una actividad que requiere de mayor tiempo y capacitación del personal que la realiza comparado con la inseminación artificial. (Seidel *et al.*, 2003).

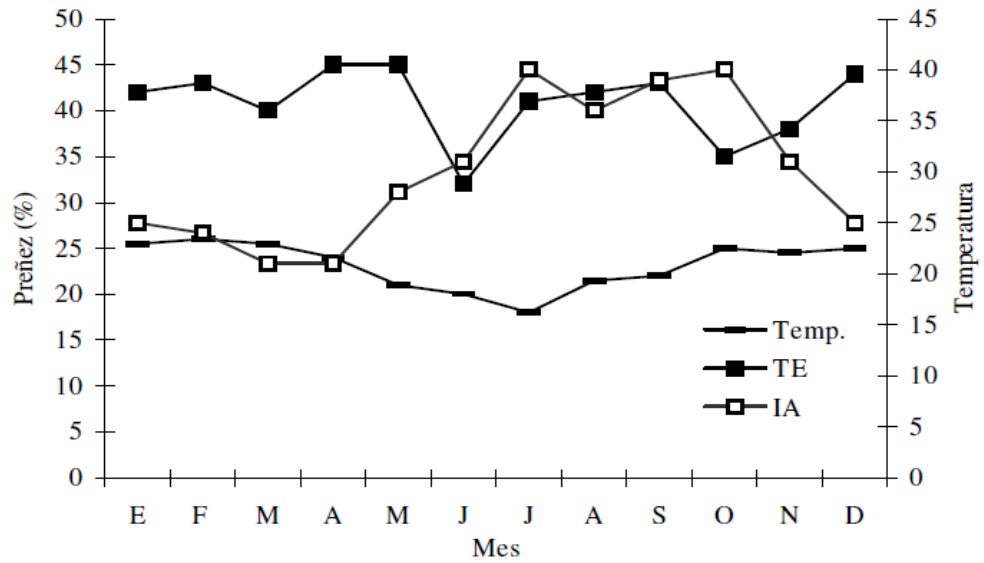


Figura 1. Diferencias en tasa de preñez entre vacas inseminadas y vacas con embrión transferido en diferentes climas (Rodríguez *et al.*, 2004).

2.4.2. Falla en la predicción de resultados.

Un gran limitante en los programas de TE es la inconsistencia en los resultados; con un mismo tratamiento y bajo las mismas condiciones de manejo, la respuesta ovulatoria puede variar grandemente entre vacas y entre superovulaciones sucesivas en una misma vaca. Esta biotecnología depende de muchos factores que pueden influir sobre los resultados de la misma (Mapletoft, 2006).

2.5. Factores que influyen en la respuesta a la superovulación.

Existen diversos factores que pueden modificar o limitar la respuesta a la superovulación en los bovinos, es necesario revisar algunos de ellos, para posteriormente considerarlos al iniciar un tratamiento de superovulación en un programa de TE.

2.5.1. Fase del ciclo estral.

La fase del ciclo estral es una de las principales fuentes de la variabilidad en la respuesta ovárica a la superovulación. Se ha evaluado la tasa de ovulación y la producción de embriones, al administrar la hormona folículo estimulante (FSH) a diferentes momentos del ciclo estral, encontrando que a partir del día 9 del ciclo estral la respuesta ha sido mejor en comparación con tratamientos que se iniciaron en el día 3 ó 6 del ciclo (Lindsell *et al.*, 1986). En otro trabajo, se observó una menor respuesta cuando se administró la FSH en el día 2 comparado con el día 10 del ciclo, por otro lado la aplicación de FSH en el día 9 y 13 del ciclo no tuvo diferencias significativas (Hasler, 2003), esta variación se puede explicar por las ondas de desarrollo folicular que ocurren en los bovinos ya que en dichas olas existen estímulos e inhibiciones en los folículos en diferentes estadíos, siendo un factor relevante el que no exista un folículo dominante al momento de iniciar la estimulación con FSH (Adams *et al.*, 2008). Actualmente se utilizan protocolos que sincronizan la oleada de desarrollo folicular, con lo cual se logra empatar el inicio de la superovulación con la emergencia de una nueva ola, incrementando la

cantidad de estructuras recuperadas al momento de la colección, mas adelante se detalla información sobre estos protocolos.

2.5.2. Momento del inicio de los protocolos de superovulación.

Anteriormente, la mayoría de los protocolos se iniciaban aproximadamente el día 15 al 16 del ciclo estral, haciendo coincidir el inicio del tratamiento poco antes de la desaparición natural del cuerpo lúteo, bajo este esquema no era raro que los tratamientos fracasaran cuando la vaca tenía un ciclo corto y exhibía celo antes de finalizar el tratamiento. Con la aparición de la prostaglandina F_{2α} (PG) exógena y sus análogos, fue posible iniciar los protocolos de superovulación en diferentes días del ciclo estral. Siendo los más comunes entre los días 8 y 12 del ciclo (Mapletoft *et al.*, 2002). Con el uso de implantes hormonales intravaginales, en combinación con otras hormonas (P4, E2 y GnRH) se ha hecho posible iniciar los tratamientos de superovulación en cualquier etapa del ciclo estral, sin que la respuesta se vea afectada. Cuando no se usan dispositivos liberadores de progesterona, se obtienen los mejores resultados cuando se inicia la superovulación al momento que inicia una oleada de desarrollo folicular en vez de uno o dos días después de iniciada ésta (Nasser *et al.*, 1993).

2.5.3. Persistencia del folículo dominante.

Se conoce que el folículo dominante, se origina durante la oleada de desarrollo folicular e inhibe el crecimiento de los otros folículos que fueron reclutados y seleccionados durante dicha ola. Se postula que la presencia de dicha estructura podría afectar el desarrollo de un grupo de folículos subordinados hasta la ovulación al aplicar un tratamiento superovulatorio; es por ello que se han incluido dentro de los esquemas de superovulación, estrategias para desaparecer el posible efecto negativo del folículo dominante sobre los folículos que potencialmente van a ser estimulados por la FSH exógena. Para lograr esto existen una serie de tratamientos hormonales que incluyen la administración de estrógenos para inducir la regresión del folículo dominante (Colazo y Mapletoft

2007), el uso de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Bó *et al.*, 2009) para lograr la luteinización del folículo dominante, además de la ablación del folículo dominante usando una aguja que llega al ovario por vía trans-vaginal, conectada a un sistema de presión negativa (Bó *et al.*, 2002). En el 2001, se realizó un estudio donde evaluaron la respuesta a la superovulación en vacas Holstein, con y sin ablación de folículo dominante, resultando en una mayor producción de embriones transferibles en el grupo donde el folículo dominante fue removido (4.6 ± 0.9 vs 2.3 ± 0.8) ($P < 0.05$) (Kim *et al.*, 2001).

2.5.4. Edad de la donadora.

En cuanto a la edad de las donadoras se ha encontrado que el rango óptimo para superovularlas es de 3 a 8 años de edad (Seidel *et al.*, 2003). Después de esta edad la producción de embriones transferibles disminuye, debido a que disminuye la respuesta a la superovulación, ésto se debe principalmente a la reducción del pool de folículos que responden a las hormonas exógenas, además de que en animales mayores ocurren anomalías en la maduración del ovocito y se presenta una asincronía de crecimiento y maduración entre el ovocito y el folículo (Loos *et al.*, 1991).

2.5.5. Raza de la donadora.

En la literatura se encuentra abundante evidencia sobre diferencias de raza en la respuesta ovárica a la superovulación. Las comparaciones más comunes y más notables las encontramos entre el ganado *Bos taurus* y *Bos indicus* (Sartori y Barros, 2011). Las diferencias pueden estar influenciadas por múltiples factores como: el medio donde se desarrollan, el clima, estado nutricional, edad, niveles séricos de hormonas, función zootécnica, etc (Bruel *et al.*, 1991, Armstrong, 1993, Mapletoft *et al.*, 2002). A continuación, se presentan algunas diferencias entre animales europeos e índicos, relacionados con la respuesta a la superovulación, así como diferencias entre razas de la misma especie.

2.5.5.1. Aparición de oleadas de desarrollo folicular.

Un estudio comparó la aparición de la primera y segunda oleada de desarrollo folicular en animales Nelore (*Bos indicus*) y Holstein (*Bos taurus*), donde encontraron que en animales Nelore se presentan más tarde las oleadas foliculares que en animales Holstein (1.5 ± 0.15 y 12 ± 0.91 días vs 0.2 ± 0.1 y 9.6 ± 0.2 días). Para los animales que presentaron 3 oleadas, la aparición fue similar en animales Nelore y Holstein (1.57 ± 0.20 , 9.14 ± 0.47 y 15.14 ± 0.47 vs 1.9 ± 0.30 , 9.40 ± 0.5 y 16.10 ± 0.70 días respectivamente). El diámetro máximo de los folículos dominantes, fue menor en los animales Nelore (10 a 12 mm vs 14 a 20mm) (Figueiredo *et al.*, 1997).

2.5.5.2. Reclutamiento de folículos.

Al inicio de una oleada folicular de *Bos taurus* se han detectado hasta 24 folículos antrales en la fase de reclutamiento, mientras en los *Bos indicus* se han encontrado hasta 50 (Ginther *et al.*, 2001, Buratini *et al.*, 2000). Esas diferencias en la población de folículos, es una de las razones por las cuales se puede aprovechar de manera más eficiente, algunas biotecnologías como la OPU en *Bos indicus* que en *Bos taurus*. Esta condición contribuye a que las respuestas a la SO en *Bos indicus* se logren con cantidades menores de FSH exógena (Barros y Nogueira, 2001).

2.5.5.3. Otras diferencias entre *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Otras diferencias entre razas se han reportado como; la longitud de la gestación (más cortas en *Bos taurus*), el número de oleadas de desarrollo folicular, la cantidad circulante de IGF1, como se mencionó antes la cantidad de folículos en cada oleada, el diámetro de folículo dominante, el diámetro del folículo pre-ovulatorio y el diámetro de tejido lúteal (mayor en *Bos taurus*) (Sartori y Barros, 2011).

Las diferencias entre *Bos taurus* y *Bos indicus*, pudieran ser hasta cierto punto incuestionables, ya que se está hablando de dos especies distintas, sin embargo, existen trabajos que citan diferencias entre razas de la misma especie.

2.5.5.4. Diferencias entre razas *Bos taurus*.

Álvarez y colaboradores (2000,) mencionan que existen diferencias entre animales de las razas Angus y Senepol; en la dinámica folicular se encontró que la raza Senepol recluta una cantidad mayor de folículos por oleada que las vacas Angus (33 ± 4 vs 21 ± 4 , respectivamente). La raza Senepol es poseedora de excelente adaptación a climas tropicales y resistencia a enfermedades parasitarias. Los resultados de este estudio indican que la raza Senepol presenta comportamiento reproductivo similar a los *Bos indicus* (Álvarez *et al.*, 2000).

2.5.6. Fuente de gonadotropina.

La literatura reporta trabajos en los que se comparan los tres tipos básicos de gonadotropinas disponibles en el mercado que son extractos pituitarios crudos (FSH-P), extractos pituitarios purificados (Folltropin[®]-V) y gonadotropina coriónica equina (PMSG, ahora eCG). Es difícil poder advertir una ventaja clara y consistente en cualquiera de estos productos, bajo las muchas condiciones en que han sido evaluados, sin embargo, existen tendencias que indican una similitud entre FSH-P y eCG+neutra-eCG y un ligero mejor comportamiento de Folltropin-V[®], una observación interesante, es que cuando se utilizan elevadas dosis de Folltropin-V[®] la respuesta superovulatoria se ve reducida, este efecto negativo no se debe a las altas dosis de FSH, sino a la mayor cantidad de LH que se administra. Se ha comprobado un marcado efecto de lote en la respuesta superovulatoria a gonadotropinas y se demostró posteriormente que estas diferencias se debían primordialmente a las diferencias entre lotes de la proporción de LH en el extracto, lotes de extracto pituitario con una elevada proporción de LH producen bajas respuestas superovulatorias; sin embargo, la ausencia total de LH produce respuestas bajas, por lo que son necesarias ciertas

cantidades de LH en el extracto para inducir una adecuada respuesta. La proporción de LH en Follitropin-V (~16%) se encuentra por debajo de los máximos aceptables (20%), ubicando a esta preparación hormonal como la alternativa de uso más generalizado (Seidel *et al.*, 2003 y González *et al.*, 1990).

En vacas de la raza Mertolengo, nativas de Portugal, se evaluaron diferentes tipos de gonadotropinas, encontrándose mejores resultados a la respuesta superovulatoria con FSH de extracto purificado, comparado con FSH de extracto crudo y con eCG (Lopes de Costa *et al.*, 2001).

Quaresma en el 2003, comparó dos fuentes de gonadotropinas sobre la tasas de fertilización, producción de corpúsculos (embriones degenerados, más embriones transferibles, más óvulos no fertilizados) y producción de embriones transferibles, en la raza Mertolengo, encontrando mejores resultados con la FSH que proviene de extracto purificado (baja actividad LH). La tasa de fertilización general para la FSH de extracto purificado fue de 92.2%, mientras que para la de extracto crudo fue de 32.2% ($P < 0.05$). En el caso de corpúsculos no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre la FSH purificada y la cruda (10.0 ± 2.2 vs 8.5 ± 2.4) ($P > 0.05$). Por último la producción de embriones transferibles fue más alta y estadísticamente diferente con la FSH purificada en comparación con la cruda (6.4 ± 1.2 vs 1.6 ± 0.7) ($P < 0.05$) (Quaresma *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que se obtienen mejores resultados a la SO, cuando se utiliza una fuente de gonadotropina purificada con baja actividad de LH.

2.6. Efecto de estado fisiológico y función zotécnica sobre la producción embrionaria.

En un estudio se comparó la calidad de los embriones que producen las vacas Holstein lactando, vaquillas Holstein nulíparas y hembras de razas especializadas en producción de carne. Las vacas Holstein, produjeron mayor cantidad de embriones pero de menor calidad que las vaquillas y las vacas de carne.

Aparentemente la disminución de la calidad de los embriones pudo estar relacionada con la alta producción de leche (Leroy *et al.*, 2005). Los embriones de vacas Holstein altas productoras, presentaban una tonalidad oscura; esta condición se debe a la acumulación de lípidos en el embrión, lo cual parece ser ocasionado por alteraciones en el metabolismo de lípidos (Leroy *et al.*, 2004). Estas alteraciones parecen ser ocasionadas por la ingesta de grasa en la dieta de las vacas altas productoras; éstas dietas son necesarias para cubrir los requerimientos nutricionales que demanda la producción de leche (Chebel *et al.*, 2008). Al igual que los lípidos, existe evidencia de que la suplementación con urea y altas cantidades de proteína en las dietas, pueden ocasionar cambios en el pH. Los cambios de pH provocan: una disminución de la viabilidad de los embriones, debido a cambios en el medio ambiente uterino (Dawuda *et al.*, 2002).

La alteración del metabolismo de lípidos puede promover efectos negativos en los ciclos reproductivos y en la salud de las hembras, debido a que algunas hormonas sexuales y citocinas que participan en los procesos inflamatorios, se sintetizan a partir de lípidos (Lago *et al.*, 2008).

La progesterona (P4) es una hormona esteroide que participa de manera importante en la regulación de ciclos estrales, es importante durante la gestación y se sintetiza a partir de un ácido graso modificado. La concentración circulante de dicha hormona está relacionada directamente con el mantenimiento de la gestación, además, tiene efectos directos en el desarrollo embrionario (Ake *et al.*, 1999, Díaz *et al.*, 1986).

Las vacas Holstein altas productoras, necesitan un consumo alto de materia seca para cubrir los requerimientos nutricionales que demanda la producción. Se ha mostrado que el aumento en la ingesta, aumenta el metabolismo hepático de P4 (Vasconcelos *et al.*, 2003). La alteración del metabolismo hepático, no solo se limita a P4, también se han encontrado alteraciones en los niveles circulantes de otros esteroides como el cortisol y el 17 β Estradiol (Sangsritavong *et al.*, 2002).

Alteraciones en los esteroides sexuales, dan como resultado un bajo desempeño reproductivo. Algunos de los cambios que se presentan con la alteración de los esteroides, por cambios en la ingesta son: intervalo parto-primera ovulación, luteolisis prematura, aparición de ciclos estrales de corta duración, persistencia de cuerpo lúteo, desarrollo de quistes foliculares y presencia de folículos anovulatorios (Wiltbank *et al.*, 2006).

Las alteraciones que afectan el desempeño reproductivo de hembras monoovulatorias, lo harán de manera más acentuada en donadoras que son sometidas a protocolos de SO para TE. Un estudio mostró que vacas Holstein que no se encontraban lactando y fueron sometidas a protocolos de SO, produjeron más estructuras y embriones transferibles, que aquellas que se encontraban lactando (Chebel *et al.*, 2008), estas fallas se asocian a alteraciones en el metabolismo de esteroides, debido a los altos consumos de materia seca en vacas altas productoras. Las dietas de las vacas altas productoras, contribuyen a que se desencadenen cambios en el metabolismo de esteroides. Otro esteroide importante para la reproducción, que es alterado es el estradiol; la disminución del estradiol por el aumento en su metabolismo, implica una disminución de la secreción de GnRH y posteriormente de LH, provocando una falla en la ovulación (Sangsritavong *et al.*, 2002).

3. Ciclo estral en el bovino.

El ciclo estral es un patrón cíclico de la actividad ovárica en las hembras. En términos prácticos es el tiempo que transcurre desde que ocurre una ovulación hasta que se vuelva a presentar la misma. Durante este lapso se presenta un periodo de receptividad sexual conocido como celo y otro en donde presenta nula actividad sexual. En el periodo de receptividad sexual la hembra permite la cópula en un intento por lograr una preñez. El ciclo estral en el bovino dura entre 18 y 24 días, teniendo un promedio de 21 días. Para su estudio y comprensión el ciclo estral se divide en fases que son: lútea y folicular, y por etapas: diestro, proestro,

estro y metaestro. Durante estas fases y etapas, ocurren cambios endocrinos y de conducta en las hembras, que conllevan a que ocurra la ovulación y se logre la receptividad sexual. Los cambios hormonales son regulados por un eje de glándulas endocrinas, conocido como el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios. Además de este eje también está involucrado el útero en el control endocrino del ciclo estral. El eje hipotálamo-hipófisis-ovarios y el útero sintetizan y secretan hormonas que retroalimentan de manera positiva o negativa el ciclo estral y con esto ejercen el control del mismo (Ptaszynska, 2008). En sección posterior, al explicar la dinámica folicular, se abundará en el tema del control endócrino del ciclo estral.

4. Ovogénesis y maduración del ovocito.

Los ovocitos se originan de células primordiales que provienen del endodermo específicamente del saco vitelino, estas células migran por el mesenterio primitivo hasta la cresta gonadal. Esto ocurre aproximadamente en el día 35 de gestación en los bovinos. (Erickson, 1996). Las células primordiales son sometidas a un número limitado de divisiones mitóticas durante su migración a la cresta gonadal (Adams *et al.*, 2008). Una vez que las células primordiales se encuentran en la cresta gonadal son interiorizadas en el epitelio germinal, durante el proceso de interiorización las células germinales primordiales detienen su división meiotica, son rodeadas por células epiteliales y forman los cordones germinales. Estos cordones están compuestos por células epiteliales que se delinean de las mesenquimales que rodean a la célula por una lámina basal y se forman las oogonias (Adams *et al.*, 1995). La meiosis en las oogonias inicia aproximadamente a los 80 días de gestación en los bovinos, éstas no pueden avanzar más allá de la etapa de profase I. Una capa de células epiteliales de los cordones germinales se posicionan alrededor de los ovocitos, los rodean y forman los folículos primordiales (Erickson, 1996). Los ovocitos que no son rodeados por estas células epiteliales se degeneran (Adams *et al.*, 2008).

Entonces pues, en hembras de mamífero, la ovogénesis comienza en la vida fetal. Los ovocitos entran a un proceso de meiosis para dar origen a los folículos

primordiales. Los ovocitos progresan hasta el estadio de diploteno y en este estadio de la profase meiótica I permanecen en arresto hasta la pubertad. Esta etapa no es del todo estática es más bien dinámica, ya que algunos ovocitos comienzan a crecer y activan procesos que son necesarios para concluir su maduración, fertilización y desarrollo embrionario. Esta actividad se mantiene a niveles basales y se incrementa antes de la ovulación y durante la fertilización (Ferreira *et al.*, 2009).

4.1. Maduración nuclear de ovocitos.

En la maduración de los ovocitos es necesario que ocurran dos procesos; la maduración nuclear y la maduración citoplasmática, aunque estos son procesos distintos están íntimamente relacionados y ocurren de manera simultánea (Hyttel *et al.*, 1997).

En la maduración nuclear habrá una separación de cromosomas y activación de partes específicas del nucléolo que le permitirán sintetizar proteínas específicas y factores de transcripción que son necesarios para que pueda ser fertilizado y lograr con éxito el desarrollo embrionario temprano (Meirelles *et al.*, 2004).

Durante la condensación cromosómica en el ovocito no hay activación del factor promotor de la maduración (MPF), dado que la inhibición de éste, previene el rompimiento de la vesícula germinal, sin influir en el proceso de la condensación cromosómica por lo cual el 98% de los ovocitos alcanzan el estado de vesícula germinativa. La condensación cromosómica en los ovocitos depende de la activación-inactivación del MPF, siendo la activación el papel principal para la continuidad y terminación de la maduración meiótica de los ovocitos (Wu *et al.*, 2002).

4.2. Maduración citoplasmática de ovocitos.

En la maduración citoplasmática se pueden identificar tres eventos principales; el reacomodo de los organelos celulares, los cambios en los filamentos del citoesqueleto y la maduración molecular (Ferreira *et al.*, 2009).

Durante el proceso de maduración citoplasmática la célula necesita reacomodar algunos organelos en base a la etapa en que se encuentre, ocurren cambios de distribución y morfológicos. Los organelos se movilizan utilizando los microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto, que éstos a su vez sufren cambios en dicho proceso de maduración (Stojkovic *et al.*, 2001). En los siguientes párrafos, se identifican y explican los principales eventos relacionados con la maduración citoplasmática de ovocitos.

4.2.1. Distribución mitocondrial.

En el proceso de maduración se activan rutas metabólicas que coadyuvan en la síntesis y fosforilación de proteínas. Es bien sabido que el principal organelo celular que trabaja en procesos metabólicos relacionadas con el suministro de energía es la mitocondria, como en la mayoría de procesos celulares se requiere de un aporte importante de energía; la maduración de los ovocitos no es la excepción. Por lo tanto es necesario que se movilen las mitocondrias a las zonas donde el consumo de energía será muy alto (Krisher *et al.*, 1998).

En ovocitos de bovino que fueron madurados *in vitro*, se encontró que las mitocondrias se desplazaron de la periferia donde estaba la mayoría a una distribución dispersa por todo el ovocito después de 18h de cultivo (Hyttel *et al.*, 1986). En el caso de la maduración *in vivo* ocurre algo similar, antes del estímulo de LH las mitocondrias se encuentran en la periferia y después de la extrusión del cuerpo polar se encontró una distribución dispersa de las mitocondrias, aproximadamente 19h después del pico de LH. Al llegar a la metafase II, las mitocondrias ocupan posiciones centrales junto con gotas de lípidos (Hyttel *et al.*, 1997).

Se ha encontrado una correlación con el reacomodo de las mitocondrias en los ovocitos, los niveles de ATP y el número total de células en los blastocitos. Embriones con menos ATP en el citoplasma tenían un desarrollo lento y menor número de células y reducida viabilidad (Stojkovic *et al.*, 2001).

4.2.2. Actividad de ribosomas y RNA en maduración de ovocitos.

La síntesis de nuevas proteínas es necesaria para la maduración del ovocito, para esto el ovocito debe contar con una cantidad apropiada de ribosomas. Los ribosomas sintetizan nuevas proteínas a partir de la transcripción de ARN mensajero y ribosomal. El ARN ribosomal proviene del nucléolo dónde se encuentra el material genético, éste es necesario que se exprese para que se produzca este RNA y forme nuevas proteínas. Durante la fase de crecimiento del ovocito el nucléolo esta en forma fribriilo-granular, esto indica una alta actividad de síntesis de proteínas en el ovocito. En ovocitos que se encuentran en un folículo primordial el nucléolo se encuentra solo en forma granular, lo cual indica que la síntesis de proteína es baja o inactiva (Hyttel *et al.*, 2001). Durante la metafase I de la meiosis, el ovocito aumenta la síntesis de proteína tres veces más que en la etapa de ruptura de la vesícula germinal. Cuando alcanza la metafase II la síntesis es baja, se encuentra en niveles basales, esto se debe muy probablemente a que no cuenta con un nucléolo funcional, por lo tanto la síntesis de ARN mensajero es baja (Ferreira *et al.*, 2009).

4.2.3. Función del retículo endoplasmático en la maduración de ovocitos.

Entre las principales funciones del retículo endoplasmático se encuentra que: brinda condiciones ideales para el plegamiento de proteínas, participa en la degradación de proteínas, en el metabolismo de lípidos, en la regulación del Ca²⁺, entre otras. Se ha establecido que la liberación de Ca²⁺ es mediada por el inositol 3 fosfato y el receptor de rianodina que se encuentran en la membrana del retículo endoplasmático. La liberación de Ca²⁺ es esencial para que ocurra la activación del ovocito durante la fertilización. Durante la maduración ocurren cambios

morfológicos y bioquímicos que son necesarios para que funcione de manera correcta la regulación del calcio intracelular. Posteriormente a la maduración se incrementa la sensibilidad para la liberación del Ca^{2+} . En el momento de la fertilización, cuando el espermatozoide penetra en el óvulo, se estimula una liberación de Ca^{2+} y posteriormente se da inicio con el desarrollo embrionario (Kline *et al.*, 1994).

4.2.4. Gránulos corticales y reacción cortical.

Son organelos que se encuentran en los ovocitos y se constituyen de proteínas estructurales, enzimas y glicosaminoglicanos. En ovocitos que están en la etapa de vesícula germinal, los gránulos corticales se encuentran distribuidos cerca de la membrana plasmática. La exocitosis de los gránulos corticales es un mecanismo que utiliza el ovocito para evitar la poliespermia (Conner *et al.*, 1997).

La fusión del espermatozoide-ovocito, estimula al inositol 3 fosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG), el IP3 libera calcio que se encuentra almacenado en el retículo endoplasmático, el DAG activa a una proteína quinasa C que es la que se encarga de mediar la exocitosis de los gránulos corticales. Una vez que los gránulos son liberados se producen cambios en los receptores de los espermatozoides en la zona pelúcida impidiendo que ambos gametos se unan y además se produce un endurecimiento de la membrana del ovocito (Conner *et al.*, 1997).

4.2.5. Cambios en citoesqueleto durante la maduración de ovocitos.

Los filamentos del citoesqueleto son estructuras dinámicas y adaptables que pueden permanecer sin cambios o someterse a modificaciones de acuerdo a las necesidades de la célula. El citoesqueleto apoya el proceso de la segregación de cromosomas durante la meiosis y mitosis; además, las moléculas y organelos celulares se movilizan dentro de la célula a través de ellos. Existen tres tipos de filamentos del citoesqueleto y están formados por sub-unidades que son características para cada uno. Se cuenta con microtúbulos formados por tubulina,

filamentos formados por actina y los filamentos intermedios que lo conforman diferentes sub-unidades polipeptídicas. Su principal función es dar soporte y estructura a la célula. De las fibras que conforman al citoesqueleto, los microtúbulos son los que se encuentran relacionados con el transporte de organelos celulares. En los microtúbulos se encuentran unas sub-unidades proteicas que son nombradas; dineína, dinactina y kinesina, éstas proteínas se unen a moléculas específicas de la membrana del organelo celular y gracias a esto se produce el movimiento (Alberts *et al.*, 2004).

Durante la maduración de los ovocitos ocurren cambios en la sub-unidad dineína, para que se lleve a cabo el ajuste de organelos, ésta proteína también está involucrada en el posicionamiento del huso mitótico y la migración nuclear.

Durante la etapa de vesícula germinal en el crecimiento de los ovocitos, el reordenamiento de los organelos está relacionada con la organización modificada del citoesqueleto que forma una red en la que los organelos son desplazados para ocupar su posición final. La parte más ancha de los microtúbulos está vinculado al conjunto de cromosomas que son destinados a ser extruidos fuera de la célula, y formar parte en su momento del primer cuerpo polar. La parte cónica está asociada con el conjunto que permanecerá en el ovocito y entrará en la meiosis II, durante la ovulación para de nuevo formar la placa de la metafase II. Por lo tanto, durante la meiosis de los ovocitos, el citoesqueleto todavía juega un papel fundamental garantizando que casi todo el citoplasma de la célula que está en división se mantenga en el ovocito secundario (Alberts *et al.*, 2004).

4.2.6. Cambios moleculares durante la maduración de ovocitos.

Durante la fase de crecimiento y maduración de los ovocitos se transcribe, almacena, y procesa RNA mensajero. Las proteínas que se derivan de estos ARNm están involucradas en la misma maduración y en procesos posteriores como la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, estas proteínas se almacenan y se utilizan cuando son necesarias. El ARNm transcrito durante la

maduración molecular del ovocito se acumula en vesículas, pero de manera transitoria inactiva (Sirard *et al.*, 2001).

5. Desarrollo folicular.

El crecimiento, desarrollo y maduración de los folículos son procesos fundamentales para lograr la maduración y ovulación del ovocito y con ello que la hembra bovina tenga un buen desempeño reproductivo. Las hembras bovinas nacen con un número fijo de folículos primordiales, los cuáles fueron definidos durante la etapa fetal (Yang *et al.*, 1998). El crecimiento folicular se da en dos etapas; una que es gonadotropina-independiente y otra que gonadotropina-dependiente (Webb *et al.*, 2004).

En el proceso que es gonadotropina-independiente, juega un papel importante la hormona de crecimiento. Aunque no se ha demostrado que esta hormona actúe directamente en el ovario, se han encontrado receptores en ovario en algunas especies como la rata (Carlsson *et al.*, 1993) sin embargo, en el hígado, la unión de esta hormona con su receptor causa una mayor síntesis del Factor de Crecimiento similar a Insulina 1 (IGF1).

La IGF1 tiene diversas acciones en el bovino, dependiendo de la etapa de desarrollo, por ejemplo, en folículos primarios causa crecimiento de los mismos y ayuda a su supervivencia, en folículos secundarios ayuda al crecimiento y proliferación de células de la granulosa (Silva *et al.*, 2009).

La etapa dependiente de gonadotropinas se produce en oleadas con 2 o 3 ondas por cada ciclo estral (Jaiswal *et al.*, 2009). Algunos estudios reportan que en la mayoría de los *Bos taurus* ocurren 3 oleadas por ciclo, mientras que en los *Bos indicus* la mayoría presentan solo 2 oleadas por ciclo (Sartori *et al.*, 2004 y Figueiredo *et al.*, 1997).

En cada oleada ocurre la emergencia de folículos que provienen del pool que está en el ovario, donde se produce una selección de folículos, para posteriormente

formarse el folículo dominante y este último podrá sufrir atresia o llegar a la ovulación según sea el perfil hormonal de la hembra en el momento de la dominancia (Adams, 1994).

El desarrollo de los folículos dependiente de gonadotropinas en bovinos y otras especies, está organizado en tres eventos: reclutamiento, selección y dominancia (Adams *et al.*, 2008).

5.1. Reclutamiento.

Es el inicio del crecimiento de un grupo de folículos dependientes de gonadotropinas, principalmente FSH. Se caracteriza por el crecimiento simultáneo de varios folículos de hasta 4 mm de diámetro en los 2 ovarios. La FSH se une a sus receptores en la granulosa induciendo la transcripción para la producción de la aromatasa P450, la cual transforma los andrógenos a estrógenos, proveniente de las células de la teca. El inicio de actividad de la aromatasa en la célula granulosa es un indicador de madurez del folículo en la fase de reclutamiento. Otro efecto de la FSH sobre las células de la granulosa es el estímulo a la expresión de ARNm que codifica la síntesis de la proteína conexina Cx43, la cual forma parte de los puentes celulares o uniones gap localizadas entre la granulosa y el ovocito, o entre la granulosa y la teca. Estos puentes facilitan el intercambio de iones, impulsos eléctricos y moléculas menores de 1 kD entre estos grupos celulares (Palma, 2008). El reclutamiento folicular se encuentra influenciado positivamente por IGF-I y negativamente por la folistatina. El efecto de la IGF-I ha sido demostrado mediante la administración exógena de Hormona de Crecimiento (GH) que indujo el incremento de las concentraciones de IGF-I, lo que resultó en un aumento en el número de folículos reclutados en el grupo. La aplicación de anticuerpos contra folistatina en vacas resultó en un incremento en el número de folículos del grupo, lo que demuestra el efecto antagónico de la folistatina en la

producción de FSH, y consecuentemente en el reclutamiento folicular (Adams *et al.*, 2008).

5.2. Selección.

Dentro del grupo de folículos reclutados, uno de ellos alcanzará mayor diámetro y comenzará a sintetizar inhibina y estrógenos. El incremento en las concentraciones de estradiol e inhibinas suprime la liberación de FSH en la adenohipofisis y por lo tanto disminuye la concentración circulante de FSH. Esta disminución en los niveles de FSH provoca la atresia de los folículos que acompañaban al folículo dominante. El folículo dominante se vuelve cada vez más responsivo a la LH y continua su desarrollo de manera independiente a la FSH (Ginther *et al.*, 2001).

La atresia se define como reabsorción de líquidos del antro folicular con apoptosis de los componentes celulares del folículo. Esto ocurre por la disminución en las concentraciones de FSH, que ocurre de 3-4 días después del reclutamiento (Adams *et al.*, 2008). La FSH disminuye por la acción combinada de la inhibina y el estradiol y los folículos que en ese momento son dependientes de FSH, al dejar de recibir el estímulo de la citada hormona se atresian (Adams *et al.*, 2008).

El folículo dominante es el primero en expresar receptores de LH en las células de la granulosa. El crecimiento folicular se vuelve dependiente de LH, por lo que los folículos subordinados al ser incapaces de expresar receptores de LH se atresian. Esto ocurre en los bovinos cuando los folículos adquieren un diámetro alrededor de los 8 mm (Driancourt, 2001).

5.3. Dominancia.

Esta fase se caracteriza por un crecimiento acelerado y maduración del folículo dominante. Las hormonas que produce este folículo son responsables de la

supresión de la síntesis de FSH y por lo tanto del bloqueo de la emergencia de una nueva oleada de desarrollo folicular. El diámetro del folículo dominante en bovinos puede llegar a los 15 mm en momentos previos a la ovulación (Driancourt, 2001). Cuando el folículo dominante es removido por punción o ablación folicular, se presentara un nuevo pico de FSH a las 12 horas después, dando como resultado una nueva oleada de desarrollo folicular (figura N°2) (Adams *et al.*, 2008). Como en el reclutamiento, la IGF-I parece ser un factor de crecimiento indispensable en la dominancia folicular. Animales con deficiencias en su Hormona de Crecimiento (GH), limitan la producción de IGF-I y esto se ha asociado a la suspensión de la dominancia folicular en folículos de 8 mm de diámetro. Al parecer la falta de IGF-I puede afectar parcialmente la producción de receptores de LH. En esta etapa, la LH puede estimular en el folículo la producción de Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF), un potente estimulador de la angiogénesis. Bajo la acción de VEGF el folículo dominante garantiza el suministro de sangre que transporta las gonadotropinas necesarias para finalizar su crecimiento (Lucy, 2007). En condiciones normales, el folículo dominante en ausencia de cuerpo lúteo y ante un pico preovulatorio de LH presenta ovulación, la cual se da cuando el folículo tiene entre 17 y 20 mm de diámetro (figura N°2) (Driancourt, 2001).

Cuando la oleada coincide con un cuerpo lúteo funcional y niveles elevados de progesterona se encontrará una condición de baja frecuencia en los pulsos de GnRH y LH, por lo tanto ese folículo sufrirá atresia. De forma contraria, si no se encuentra un cuerpo lúteo funcional y los niveles de progesterona son bajos, habrá un aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH y LH, lo cual provoca un incremento en el diámetro del folículo dominante, con esto aumenta la producción de estrógenos, éstos a su vez retroalimentan de forma positiva en el hipotálamo para aumentar la síntesis y secreción de GnRH, este incremento de la GnRH estimula a los gonadotropos en la adenohipofisis para secretar un pico de LH.

Este aumento en cantidad y en la frecuencia en los pulsos de LH producen el pico preovulatorio y éste a su vez provoca la ovulación de ese folículo (Lucy, 2007).

El estudio de las oleadas de desarrollo folicular, ha permitido comprender de manera clara el comportamiento reproductivo en los bovinos. Gracias al estudio de oleadas foliculares se han desarrollado protocolos de sincronización del estro y la ovulación, que permiten aumentar la eficiencia reproductiva en los hatos de leche y carne. (Adams *et al.*, 2008, Motta *et al.*, 2011, Jaiswal *et al.*, 2009, Figueiredo *et al.*, 1997).

Las oleadas foliculares han sido caracterizadas en diferentes razas de bovinos, en donde se ha encontrado; diferencias en tiempo de duración, cantidad de folículos reclutados por oleada, número de oleadas y diámetros de folículos. (Álvarez *et al.*, 2000, Jaiswal *et al.*, 2009). Derivado del diámetro de folículos, se presentan diferencias en el diámetro del cuerpo lúteo y subsecuentemente en los niveles séricos de hormonas esteroides como la progesterona (P4) y estrógenos (E2) (Sartori y Barros, 2011).

El número de oleadas foliculares, está determinado por la duración de la fase lútea del ciclo estral (Ginter *et al.*, 1989), pudiendo presentar desde una hasta cuatro oleadas por ciclo (Sartori y Barros, 2011), es muy raro encontrar 1 o 4 oleadas siendo dos y tres lo más común (Jaiswal *et al.*, 2009). Un estudio mostró que en vacas y vaquillas de la raza Nelore (*Bos indicus*), se presentaron en su mayoría 2 y 3 oleadas, de manera similar a estudios realizados en animales de razas europeas (*Bos taurus*) (Figueiredo *et al.*, 1997).

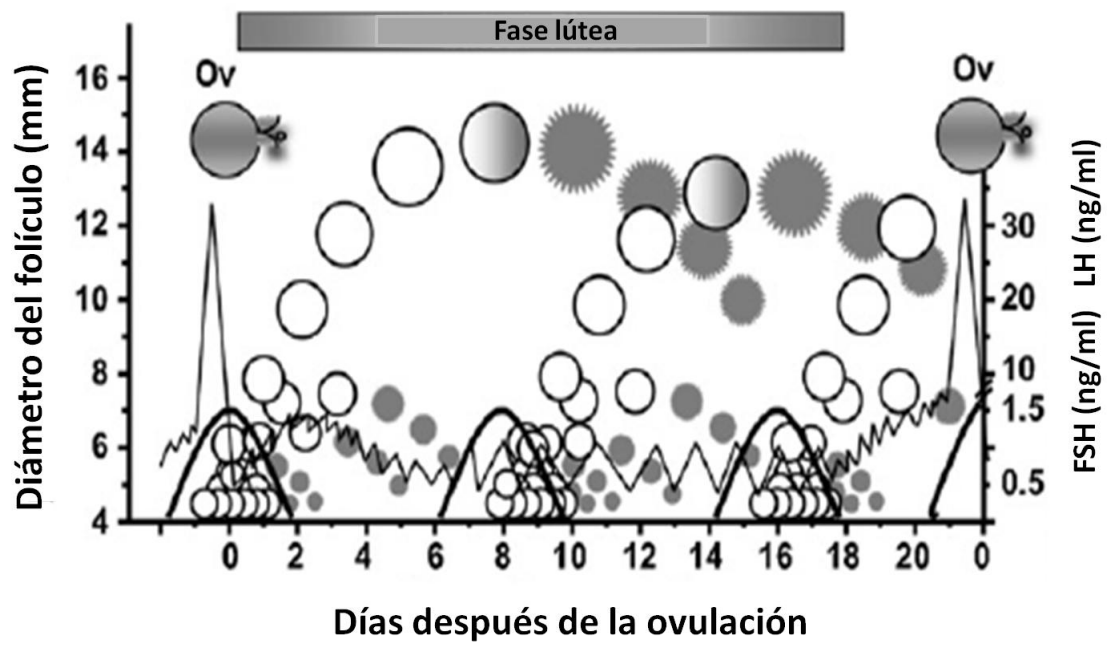


Figura 2. Esquema de oleadas de desarrollo folicular en el bovino (Adams *et al.*, 2008).

6. FSH Consideraciones generales de uso.

La FSH tiene una vida media en el organismo de 3 a 5 horas; se recomienda que sea administrada dos veces al día para producir una máxima respuesta superovulatoria. La duración del tratamiento es entre 4 y 5 días utilizando una dosis total de 28 a 50 mg de extracto pituitario crudo (FSH-P) y 280 a 400 mg de extracto pituitario purificado (NIH-FSH-PI) Folltropin V. se utiliza prostaglandina F2 α para lizar el cuerpo lúteo en el momento oportuno de desarrollo de los folículos hiperestimulados y que se maduren estos hasta su estado preovulatorio; las ovulaciones ocurren entre 36 y 48 h después de iniciado el celo (Staigmiller *et al.*, 1992).

6.1. Dosis de FSH.

Se debe considerar de manera preponderante la dosis de FSH a utilizar. Para determinar la cantidad total a aplicar, se debe conocer la raza, función zootécnica y talla. Existe información que indica que si la dosis de FSH es baja, se produce una pobre o nula respuesta superovulatoria, y por otro lado si se aplica hormona de manera exagerada, se produce una sobreestimulación ovárica que puede resultar en muy pocos embriones transferibles (Kanitz *et al.*, 2002).

Existe información en pequeños rumiantes que señala que para obtener resultados favorables en la SO, se debe considerar el peso del animal, ya que se encontró que animales de mayor peso o talla necesitan cantidades mayor de FSH, para lograr respuestas favorables (Rahman *et al.*, 2014).

Para bovinos Holstein (*Bos taurus*) se ha considerado como dosis recomendable 400mg de FSH total en protocolos de SO (Hasler, 2003, Sumrestprasong *et al.*, 2008), para animales *Bos taurus* productores de carne, se recomienda utilizar de dosis total de 260 a 280 mg de FSH de manera comercial (Folltropin-V[®]) (Seidel *et al.*, 2003). Estos autores reportan resultados favorables a la SO con las dosis mencionadas.

Para el caso de los animales *Bos indicus*, se habla de que presentan mayor sensibilidad a la FSH exógena y reclutan mayor cantidad de folículos por oleada, haciendo que se necesite menor cantidad de FSH exógena (Sartori y Barros, 2011).

6.2. Dosis reducidas de FSH en protocolos de Superovulación.

6.2.1. Dosis reducidas de FSH en ganado *Bos indicus*.

Un estudio evaluó la producción de embriones transferibles utilizando dosis reducidas de FSH en vacas Nelore, donde no se encontraron diferencias estadísticas significativas para las dosis de 100, 133 y 200 mg de FSH, concluyendo que se pueden utilizar de 180 a 200 mg de FSH en animales *Bos indicus*, sin efectos negativos y obteniendo resultados favorables (Baruselli *et al.*, 2006). En ganado *Bos indicus* del trópico mexicano, se encontraron resultados menores, donde al usar 18 mg de FSH se obtuvieron 1.67 ± 0.47 embriones transferibles y 1.32 ± 0.48 con 24 mg, y aunque la cantidad de embriones es menor a la raza Japonesa no hubo diferencias en la producción de embriones entre dosis alta y baja (De La Torre *et al.*, 1992).

6.2.2. Uso de dosis reducidas de FSH en ganado criollo lechero tropical Mexicano.

Existe poca información sobre la respuesta a la SO en bovinos criollo mexicanos, en 2013 se publicó un trabajo de tesis, donde evaluaron la respuesta a la SO con dosis reducidas de FSH en bovinos criollo lechero tropical, según el autor, las dosis reducidas pudieran funcionar por la pequeña talla del animal y por sus antecedentes de buena fertilidad. Este trabajo concluyó que no existen diferencias entre las dosis alta y media de FSH (260 y 210 mg), sin embargo, encontraron una baja respuesta a la dosis baja (160mg) (Rosales, 2013). De manera general, la producción de embriones transferibles fue menor a la media que se maneja en otras razas *Bos taurus* y *Bos indicus* (Hasler, 2003 y Baruselli *et al.*, 2006),

obteniendo en este trabajo para dosis alta 3.2 ± 0.7 embriones transferibles y 3.0 ± 0.8 embriones transferibles con dosis media (Rosales, 2013).

6.2.3. Uso de dosis reducidas de FSH en ganado nativo cruzado.

Un estudio que se realizó en Tailandia, con bovinos cruzados de Holstein (*Bos taurus*) con nativo Thai Tailandia (*Bos indicus*), disminuyó la cantidad de 400mg de FSH a 360 y 260mg, donde los autores no encontraron diferencias estadísticas significativas en la producción de embriones transferibles. Para 360 mg se encontró una media de 4.2 ± 0.7 embriones transferibles y 4.3 ± 0.6 con 260mg de FSH (Sumretprasong *et al.*, 2008). En este trabajo con animales cruzados se encontró una media más alta en la producción de embriones transferibles en comparación con el trabajo que se realizó en criollo mexicano (Rosales, 2013).

6.2.4. Uso de dosis reducidas de FSH en donadoras nativas en Corea.

Se evaluaron dosis reducidas de extracto pituitario crudo, donde reportan que al utilizar 28mg se obtuvieron 3.4 ± 0.8 embriones transferibles y 3.2 ± 0.7 con 24mg (Son *et al.*, 2007). demostrando que al usar dosis reducidas de FSH se obtienen resultados similares a dosis mayores, aunque en esta raza nativa se producen menos embriones transferibles comparado a lo que se reporta en otros trabajos tanto en *Bos taurus* como *Bos indicus* (Hasler, 2003 y Baruselli *et al.*, 2006). Los resultados de las vacas nativas son similares a los que se obtuvieron en bovinos criollo mexicano con dosis reducidas, aunque en el estudio del criollo, se utilizó extracto purificado (Rosales, 2013).

6.2.5. Uso de dosis reducidas de FSH en ganado nativo de Japón.

En Japón se evaluaron dosis reducidas de FSH, en ganado negro Japonés, donde encontraron medias de producción de embriones transferibles de; 4.6 ± 5.2 con 16mg, 4.4 ± 3.7 con 24mg y 2.0 ± 4.01 con 30 mg, concluyendo que se pueden utilizar dosis reducidas, sin efectos negativos en esa raza (Sugano y Watanabe, 1997).

6.2.6. Uso de dosis reducidas de FSH en donadoras Sistani.

En el medio Oriente, se evaluó la respuesta a la SO, en vacas nativas Sistani (*Bos indicus*), con tres dosis bajas de FSH purificada (120, 160 y 200mg). Se encontró una mayor cantidad de cuerpos lúteos y corpúsculos con la dosis de 200 mg, sin embargo no hubo diferencias en embriones transferibles para las tres dosis reportando una media general de 3.1 ± 0.58 (Barati *et al.*, 2006). Estos resultados en *Bos indicus*, son mayores a los que se reportaron en el trópico mexicano (De La Torre *et al.*, 1992), pero menores a los reportados en trabajos con animales Nelore en Brasil (Baruselli *et al.*, 2006), lo cual sugiere, que animales nativos presentan mejores resultados por sus características rusticas, pero, presentan menor producción de embriones cuando se les compara con animales que han sido seleccionados genéticamente para esos fines.

6.2.7. Uso de dosis reducidas de FSH en criollos Colombianos.

En Colombia, se identifican 7 razas de bovinos criollo. Se realizó un experimento donde se evaluó la respuesta a la SO con dos dosis de FSH de extracto crudo en estas siete razas. Para la dosis alta utilizaron 36mg, mientras que para la baja se utilizaron 24mg. No se encontraron diferencias estadísticas significativas para ninguna variable evaluada, donde en promedio se obtuvieron 1.4 ± 0.81 embriones transferibles con la dosis alta (36mg) y 1.43 ± 0.96 embriones transferibles con la dosis baja (24mg) (Estrada *et al.*, 1998). Estos estudios demuestran que no existen diferencias al utilizar dosis altas o reducidas de FSH en ganado criollo, y la baja cantidad de embriones transferibles que producen pueda ser ocasionada por otros factores independientes a la dosis de gonadotropina.

6.2.8. Uso de dosis reducidas de FSH, en donadoras de raza compuesta que incluye ganado criollo Tailandés.

Por último, en un estudio que evaluó dosis reducidas y edades en animales cruzados con razas criollo (25%), *Bos taurus* (50%) y *Bos indicus* (25%) en Tailandia, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en ninguna de

las variables evaluadas, obteniendo 8.50 ± 3.48 embriones transferibles con 200 mg y 3.50 ± 3.48 embriones transferibles con 250 mg en vacas adultas, mientras que en vaquillas con 200 mg se reportan 9.75 ± 3.01 embriones transferibles y 7.75 ± 3.01 embriones con 250 mg. Los autores le atribuyen una menor respuesta a la SO en vacas adultas, debido a cambios endocrinos y en la disponibilidad de folículos cuando aumenta la edad (Nilchuen *et al.*, 2012).

6.3. Variantes en los protocolos de superovulación.

6.3.1. Programa de reciclado rápido de donadoras. (DQTA)

El intervalo normal entre tratamientos en donadoras, que hasta hacia pocos años era de 70 días, con este programa se reduce a un rango de 35 a 39 días, sin afectar la tasa de respuesta. Se basa en el uso de dispositivos intravaginales liberadores de progesterona. Con estos programas se permite el uso más eficiente de donadoras. Este protocolo consiste en que a la recuperación de embriones, se aplica prostaglandina F_{2α} y el dispositivo intravaginal, (día 0); diez días después, se retira el dispositivo intravaginal y se aplica nuevamente prostaglandina F_{2α}, (día 10). La donadora presenta estro 3 días después del retiro del dispositivo y de la inyección de la prostaglandina, (día 13) posteriormente se inicia la siguiente superovulación doce días después, (día 25) y la donadora entra en estro 5 días después, (día 30) se realiza la colección de embriones 7 días después, (día 37). Si no se observa la vaca en estro a los tres días de removido el CIDR, se inserta otro y se inicia la superovulación cinco días después (Hasler, 2003).

6.3.2. Sincronización de la oleada de desarrollo folicular.

Para poder realizar el reciclado rápido es necesario sincronizar la oleada de desarrollo folicular, estos protocolos tienen la ventaja de que se puede iniciar la superovulación en cualquier día y en el momento que los especialistas los decidan, dejando de lado la detección de celos.

Esta sincronización se basa en el uso de estrógenos y progestágenos. Se inicia con una aplicación de un estrógeno, que puede ser cipionato o benzoato de estradiol, generalmente se utiliza benzoato ya que tiene una vida media más corta y se han reportado mejores resultados que con el cipionato.

Al momento de la aplicación de estradiol (2 a 5 mg) se coloca un dispositivo intravaginal de progesterona, además, de progesterona por vía parenteral (100mg) (Bó *et al.*, 2002 y Bó *et al.*, 2006).

Estos protocolos causan la supresión de la síntesis y liberación de las gonadotropinas, causando la regresión o atresia de los folículos en crecimiento, después que desaparece el efecto del estradiol, inicia nuevamente la liberación de FSH e inicia una nueva oleada de desarrollo folicular aproximadamente 4 días después de iniciado el tratamiento de sincronización (Bo *et al.*, 1995).

Por lo general los protocolos de superovulación se inician entre el cuarto y quinto día después de la sincronización de la oleada, lo más común es aplicar dos inyecciones diarias con intervalos de 12 horas y en cantidades decrecientes. Algunos protocolos aplican la PG en el día 3 de la superovulación de igual manera con dos inyecciones, otros aplican la PG el día 4 y no vuelven a aplicar FSH, en esas circunstancias se ha reportado éxito al inducir una respuesta superovulatoria (Bó *et al.*, 1995).

6.3.3. Variantes en la duración de dispositivos intravaginales de progesterona. (P4)

La duración común del dispositivo intravaginal de progesterona (P4), es de 7 u 8 días, el retiro del dispositivo coincide con la aplicación de la PG durante la superovulación. Algunos trabajos han modificado los tiempos de retiro del dispositivo con P4, buscando sincronizar las ovulaciones y realizar inseminaciones a tiempo fijo. Estos protocolos utilizan un inductor de la ovulación como la LH. Algunos investigadores refieren postergar el uso del dispositivo 36 horas después de la aplicación de la PG, 12 horas después aplicar el inductor (48 horas post

aplicación de la PG), obteniendo buenos resultados sin la necesidad de detectar calores. Con animales *Bos indicus* en el trópico, se ha retrasado el retiro del dispositivo 12 horas después de la aplicación de la PG, posteriormente aplicando GnRH como inductor de la ovulación a 12 y 24 horas después del retiro, teniendo diferentes resultados, siendo más eficiente la aplicación del GnRH 12 horas después. Este manejo es una opción para disminuir el número de inseminaciones por donadora, generalmente se realiza la inseminación a las 12 y 24 horas de la inducción de la ovulación o detección del celo, al retrasar el retiro del dispositivo y utilizando inductores de la ovulación (GnRH/LH) se puede realizar una sola inseminación a las 16 horas después de la aplicación del inductor de ovulación (Baruselli *et al.*, 2006).

6.3.4. GnRH y LH como inductores de la ovulación.

El GnRH ha demostrado que causa la ovulación o la luteinización del folículo con mayor tamaño al momento de la aplicación, logrando una nueva oleada de desarrollo folicular dos días después de su aplicación (Macmillan *et al.*, 1991). Otros estudios refieren que solo se inicia una nueva oleada de desarrollo folicular cuando ocurre la ovulación, una luteinización no ocasiona el inicio de una nueva oleada (Martínez, 1999), por otro lado existen datos muy variables sobre el porcentaje de animales que ovulan después de la aplicación de GnRH y LH, teniendo como rango 44% al 85% (Colazo *et al.*, 2009 y Pursley *et al.*, 1995).

6.3.5. Protocolos actuales de superovulación.

Las dos aplicaciones diarias de FSH ha resultado en buenos resultados en la producción de embriones en los programas de superovulación, sin embargo, este procedimiento representa mayor manejo para las donadoras, aumento de estrés y numerosos riesgos de cometer errores al aplicar la gonadotropina. Por lo tanto en la actualidad se busca diseñar protocolos de superovulación con menos aplicaciones que disminuyan el manejo y el estrés que éste genera además de disminuir los costos. Se han realizado trabajos donde se aplica una sola dosis total

de 400 mg de FSH de manera subcutánea, la respuesta fue variable y al parecer depende en gran parte de la condición corporal de la donadora, ya que en los lugares que se aplicó y si las donantes tenían mayor o menor cantidad de grasa la absorción de la FSH fue diferente (Bo *et al.*, 1994 y Lovie *et al.*, 1994).

Alternativas para poder utilizar el protocolo de una sola aplicación, es la de conjugar a la FSH con moléculas que permitan una liberación lenta en el organismo de manera independiente a la cantidad de grasa que tengan las donadoras. Uno de los compuestos utilizados para lograr esto es el Hialuronato, algunos trabajos han reportado resultados similares en producción de embriones entre los protocolos tradicionales de superovulación y los tratados con una sola inyección de FSH con Hialuronato (Tribulo *et al.*, 2011).

Este protocolo consistía inicialmente en utilizar 20 mg/ml de Hialuronato; sin embargo se encontró que era difícil de mezclar en campo y se optó por utilizar la mitad de esa dosis. Los resultados obtenidos con 10mg/ml fueron que resultó más sencillo mezclar la FSH, pero que sin embargo, hubo una menor respuesta a la superovulación. Al parecer con la dosis más baja fue más rápida la absorción de la FSH y no se logró el efecto por el tiempo deseado (Tribulo *et al.*, 2011).

En base a lo anterior se han realizado estudios donde se aplicó la FSH en la dosis media de Hialuronato (10mg/ml), con dos aplicaciones con intervalo de 48 horas entre la primera y la segunda, encontrando resultados similares a los obtenidos con el protocolo tradicional de dos inyecciones diarias durante 4 días (Tribulo *et al.*, 2012).

7. El estrés calórico como factor que impacta de manera negativa el desempeño reproductivo en los bovinos.

El estrés calórico afecta con mayor severidad a aquellas razas que son originarias de climas templados o fríos y son llevadas a climas tropicales ó cálidos, siendo en

general más resistentes las razas *Bos indicus* que las *Bos taurus* (Álvarez *et al.*, 2000, Hansen, 2004).

Los bovinos son animales homeotermos, los cuales mantienen la temperatura corporal gracias a su metabolismo celular de manera independiente a la temperatura del medio ambiente, sin embargo, los cambios en la temperatura ambiental pueden provocar que los bovinos salgan del equilibrio térmico y activen distintos mecanismos fisiológicos compensatorios que se encargarán de regresarlos a dicho equilibrio. Estos mecanismos son eficientes en ciertos rangos de temperatura y humedad; una vez que el ambiente rebasa dichos rangos, se vuelven ineficientes los mecanismos de control como: jadeo y sudoración provocando que el animal entre en estrés térmico. Se ha reportado que el estrés calórico provoca una disminución de la ingesta, lo cual limita la disponibilidad de energía del organismo, limitando la misma para procesos productivos y reproductivos (De Renis y Scarramuzzi, 2003). La disminución de energía durante el desarrollo y maduración del folículo, trae como consecuencias fallas en la fertilización y en el posterior desarrollo embrionario en fases tempranas (Scarramuzzi *et al.*, 2011).

7.1. Susceptibilidad al estrés calórico entre razas de bovinos.

Una de las razas más susceptibles al estrés calórico es la Holstein; en un estudio se evaluó la fertilidad al primer servicio durante las diferentes estaciones del año, encontrando que este valor fue más alto en animales que tuvieron su servicio en el periodo de invierno/verano ($63.8\% \pm 0.4$), y más baja en el periodo de verano/otoño ($40.2\% \pm 1.5$), a la par de esta evaluación se recolectaron ovocitos para madurar y fertilizar *in vitro*, donde se corroboró un efecto de estaciones. Se encontraron tasas mayores de maduración meiótica en los ovocitos que fueron colectados durante los meses fríos ($78.4\% \pm 8.0$) en comparación de los que fueron colectados en meses cálidos (44.3 ± 8.1) ($P < 0.05$). Los ovocitos se maduraron 3 diferentes temperaturas (38.5°C , 39.5°C y 40.5°C), encontrando que los embriones

resultantes de la maduración a 38.5°C tuvieron la mayor tasa de desarrollo y división embrionaria (70.7%±2), que los que se maduraron en uno y dos grados por encima de la temperatura corporal normal del bovino (35.4%±4 y 15.5%±2), acentuando nuevamente el efecto de la temperatura sobre el desempeño reproductivo (Pavani *et al.*, 2015).

En vaquillas Holstein, se ha publicado que disminuye su tasa de concepción hasta en 31% en épocas de verano comparado con el invierno (Donovan *et al.*, 2003). Otro estudio encontró que vaquillas Holstein, que fueron sometidas a protocolos de SO, en periodos donde se encontraban bajo estrés calórico, produjeron más embriones de pobre calidad y degenerados (Putney *et al.*, 1989).

Por otro lado, existen razas con mayor tolerancia al estrés calórico, tal es el caso de los cebuinos y algunas razas europeas que han sido seleccionadas para ser más tolerantes a dichos efectos ambientales (Hansen, 2004, Álvarez, 2000).

III. JUSTIFICACIÓN.

Como ya ha sido revisado, la respuesta a la superovulación, en términos de producción de embriones transferibles, se encuentra influenciada tanto por factores que no son inherentes a la donadora, como son: estaciones del año, medio ambiente, fuente de gonadotropina, dosis de total de FSH, manejo para cumplir con una función zootécnica, dietas, etc (Breuel *et al.*, 1991, Kanitz *et al.*, 2002, Rahman *et al.*, 2014, Chebel *et al.*, 2008, Wiltbank *et al.*, 2006), como por factores que son propios de la donadora como son: raza, edad, estado nutricional y talla (Breuel *et al.*, 1991, Kanitz *et al.*, 2002, Rahman *et al.*, 2014, Ali *et al.*, 2012). Entre estos últimos destaca el efecto de la raza, tanto por la respuesta particular que determinados genotipos pueden exhibir, como por su relación con la talla y por ende el peso corporal.

Por lo tanto un factor fundamental para el éxito de la TE es el desarrollo de protocolos de SO adecuados a la raza y talla de la donadora. La necesidad de utilizar variantes en los protocolos de SO obedece a diferencias fisiológicas que existen entre las razas de las donadoras (Baruselli *et al.*, 2006).

Caso particular es el de los bovinos criollos, en donde al ser de biotipo *Bos taurus*, se pensaría en trabajar con protocolos que se han desarrollado y probado en otras razas de la misma especie; sin embargo, como lo refiere la literatura, el criollo mexicano presenta algunas características similares a los animales *Bos indicus* (Zárate *et al.*, 2010), además de ser animales de menor talla, tienen la habilidad de aprovechar dietas de pobre contenido nutricional, son animales perfectamente adaptados a zonas tropicales y semiáridas, con cobertura de vegetación nativa y la función zootécnica no las exige a modificar sus rutas metabólicas, en comparación con otras razas taurinas. Con base a esta información, se genera la posibilidad de que los bovinos criollo Coreños, pudieran producir respuestas a la SO, de manera eficiente y exitosa con dosis reducidas de FSH, al igual que otros genotipos criollos como el Criollo lechero tropical, Thai Tailandia, Sistani, criollos colombianos y los nativos de Korea y Japón.

IV. OBJETIVO

Evaluar la respuesta ovárica a la superovulación en ganado bovino Criollo mexicano, utilizando tres dosis reducidas de FSH

V. HIPOTESIS.

Dosis reducidas de FSH de 200 y 140 mg, resultarán igualmente efectivas en hembras criollas para estimular las ovulaciones múltiples y la producción de embriones, que la dosis de 280 mg.

VI. MATERIALES Y METODOS.

1. Localización.

Este estudio se realizó en el sitio experimental el Verdineño del INIFAP, el cual se encuentra localizado en el municipio de Santiago Ixcuintla en el estado de Nayarit en las coordenadas; longitud- Oeste: 105.12916667 y latitud -Norte: 21.70250000, cuenta con un clima tropical subhúmedo cálido, según la clasificación climática de INIFAP (Medina *et al.*, 1998), con una altitud aproximada de 30 metros sobre el nivel del mar, su temperatura media anual es de 25.1°C llegando a tener una máxima de 33.5°C y una mínima de 18.9°C, el promedio de precipitación anual es alrededor de 1,201 mm (Sistema estatal de monitoreo Agroclimático de Nayarit).

2. Etapas de la fase experimental.

Se llevaron a cabo dos experimentos. El primero se realizó durante los meses de Junio a Octubre del 2013 donde se utilizaron 12 vacas con edades de 9 a 17 años. El segundo se realizó durante los meses Abril a Julio de 2014 y se utilizaron 6 vaquillas con edades de 2 y 3 años. Los protocolos de sincronización y superovulación que se utilizaron en los dos experimentos fueron los mismos, así como las variables evaluadas y el diseño experimental utilizado. Esto será descrito más adelante, sin embargo, cabe mencionar que al inicio de cada experimento, las hembras fueron sometidas a un protocolo de sincronización de la oleada de desarrollo folicular, para hacer coincidir la aparición de una nueva oleada con el inicio del protocolo de superovulación.

3. Evaluación y selección de donadoras de raza criollo para programa de superovulación.

Se utilizaron 12 vacas y 6 vaquillas de la raza criollo de tipo Coreño, cuyo tipo racial fue verificado con base a la guía de descriptores raciales de la raza criollo mexicano publicada por la Asociación de Criadores de Ganado Criollo Mexicano

A.C.(ASOCRIOLLO) (2010), además, se conocen los antecedentes de este hatu desde 1982, y el lugar de donde provienen, que es una región en la Sierra Madre Occidental en el estado de Nayarit, con accesos muy limitados y donde se tiene información de que a esta región no han ingresado razas de reciente introducción al país, lo que asegura la pureza racial de estos animales (Martínez, 2005). Se realizó un examen físico que consistió en; un examen clínico general para determinar estado de salud. Se revisó el estado sanitario del rancho en cuanto a enfermedades que afecten el desempeño reproductivo, se evaluó la condición corporal y su estado fisiológico y reproductivo.

En las hembras en las que se confirmó la ausencia de preñez se evaluó la condición ovárica, para garantizar la ausencia de quistes, adherencias y otras patologías con el uso de un ultrasonido portátil con un transductor rectal de 7.5 MHz, además, se evaluó la morfología e integridad del tracto reproductor. En el cérvix se pasó un estilete a través de éste para confirmar la ausencia de fibrosis y malformaciones.

La edad de las hembras fue de un rango muy amplio en el primer experimento, donde se utilizaron 12 vacas adultas cuyas edades oscilaron entre los 9 y 17 años de edad con un promedio de 12.4 ± 2.93 años, es pertinente mencionar que aunque estas hembras quedan completamente fuera de los parámetros óptimos recomendados para ser partícipes en programas de ovulaciones múltiples y transferencia de embriones, se tomó la determinación de usarlas toda vez que la realización de estos trabajos tiene también como objeto la obtención de embriones congelados como parte del rescate y conservación de esta raza, puntualizando que por sus características raciales era imperativo tratar de obtener embriones. En cuanto a los demás requisitos como; estar sanas, libres de enfermedades, buena condición corporal, que su tracto reproductor no tuviera adherencias o malformaciones y que se pudiera pasar sin complicaciones un aplicador de inseminación artificial a través del cervix, que estas hembras debieron cumplir para ser usadas como donadoras, éstos fueron cumplidos a cabalidad.

En el segundo experimento, se utilizaron animales más jóvenes donde el rango de edad fue de 2 años 5 meses a 3 años ocho meses.

4. Manejo de los animales experimentales.

Las hembras en ambos experimentos fueron confinadas y alimentadas con una dieta que consistió en un concentrado que contenía: alfalfa, sorgo, pasta de canola, salvado de trigo, melaza, urea, sal granulada, minerales comerciales, levaduras comerciales y grasas de sobre paso. Con un contenido total de 15.5% de proteína cruda y 2.88 Mcal/Kg de EM. Se ofreció de 3 a 4 Kg de concentrado por día dependiendo de la condición corporal y si tenía o no cría al pío. La fuente de forraje que se utilizó fue paja de frijol y paja de pasto pangola amoniato a libre acceso. Esta dieta se ofreció dos meses antes de iniciar con la sincronización y superovulación de los semovientes y durante toda la fase experimental. Las hembras del experimento 1, iniciaron con un promedio de condición corporal de 5.83 ± 0.57 y finalizaron con 6.41 ± 0.66 , por otro lado las vaquillas del experimento 2 iniciaron con un promedio de condición corporal de 6 ± 0 y finalizaron con 6.42 ± 0.53 .

4.1. Evaluación de condición corporal.

Se utilizó la escala de 1 a 9 que propone Pruitt de la Universidad de Oklahoma en donde 1 es un animal extremadamente emaciado y 9 muy obeso (Eversole *et al.*, 2009). Las evaluaciones se realizaron al momento de la colección embrionaria y por el mismo evaluador en todas las repeticiones.

5. Sincronización y superovulación de las donadoras.

Cada etapa constó de tres superovulaciones sucesivas con un intervalo de 33 a 38 días entre tratamientos. Al inicio de cada etapa se utilizó un protocolo de sincronización de la oleada de desarrollo folicular utilizando; 2 y 5 mg de benzoato

de estradiol (para vaquillas y vacas, respectivamente) (Benzoato de estradiol, laboratorio Syntex®), más 100mg de P4 intramuscular (Progesterona inyectable, laboratorio Pfizer®) , y la inserción de un dispositivo intravaginal conteniendo 1 gr de P4 (DIB dispositivo intravaginal bovino, laboratorio Syntex®). Al quinto día de iniciado el protocolo de sincronización de la oleada de desarrollo folicular, se inició con la aplicación de la FSH (Folltropin- V®) de manera fraccionada y decreciente durante 4 días en dos aplicaciones diarias con intervalos de 12 horas (figura N° 3).

Figura 3. Protocolo de sincronización de oleada, superovulación y colección de embriones en vacas de la raza Criollo. DIV=Dispositivo Intra-Vaginal con progesterona.

Los tratamientos consistieron en tres dosis totales de FSH que fueron una dosis de 280 mg que se considera estándar para ganado *Bos taurus* de talla mediana de razas productoras de carne (Seidel *et al.*, 2003) y dos tratamientos con dosis reducida (200 y 140 mg). El esquema de aplicación fraccionada y decreciente de la FHS se describe en la tabla 1: Los tres tratamientos se aplicaron a cada unidad experimental durante tres diferentes periodos, para lo cual se aplicó un protocolo de reciclado rápido de donadoras, el cual utiliza dispositivos intravaginales de P4 para garantizar desaparecer el efecto del tratamiento anterior antes de iniciar uno nuevo (figura N° 4).

6. Reciclado rápido de donadoras.

Este protocolo consistió en lo siguiente: al finalizar la recuperación de embriones, se aplicaron 25 mg de PGF2 α y un dispositivo intravaginal de progesterona; diez días después, se retiró el dispositivo y se aplicó PGF2 α , 3 días después se vigiló a las donadoras para detectar el comportamiento de estro; 12 días después de esto se inicia un nuevo protocolo de superovulación; 5 días después de iniciado el protocolo de superovulación las vacas fueron inseminadas; por último, se realizó la colecta de embriones a los 7 días después del servicio de inseminación. (figura N° 4) (Hasler, 2003).

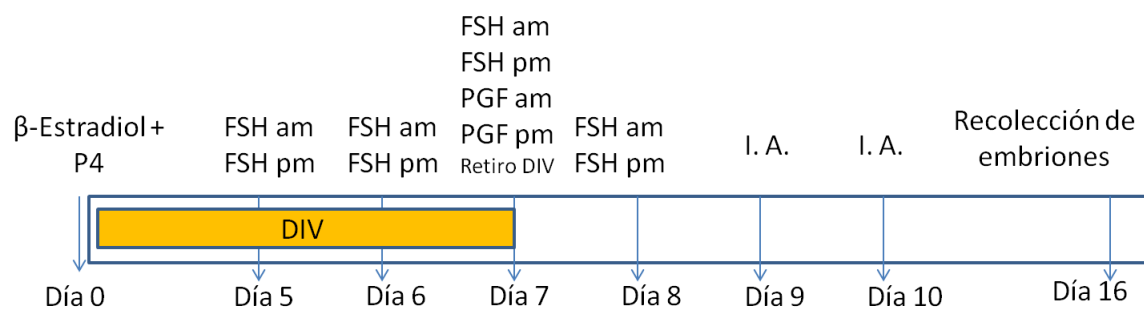


Figura 4. Protocolo de sincronización de oleada, superovulación y colección de embriones en vacas de la raza criollo. DIV=Dispositivo Intra-Vaginal con progesterona.

Tabla 1. Tratamientos de superovulación en vacas de la raza criollo.

Numero de inyección	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
1	60 mg FSH	40 mg FSH	30 mg FSH
2	60 mg FSH	40 mg FSH	30 mg FSH
3	40 mg FSH	30 mg FSH	20 mg FSH
4	40 mg FSH	30 mg FSH	20 mg FSH
5	20 mg FSH	15 mg FSH	10 mg FSH
5a	25 mg PGF2 α	25 mg PGF2 α	25 mg PGF2 α
6	20 mg FSH	15 mg FSH	10 mg FSH
6b	12.5 mg PGF2 α	12.5 mg PGF2 α	12.5 mg PGF2 α
7	20 mg FSH	15 mg FSH	10 mg FSH
8	20 mg FSH	15 mg FSH	10 mg FSH
Dosis Total	280 FSH	200 FSH	140 FSH

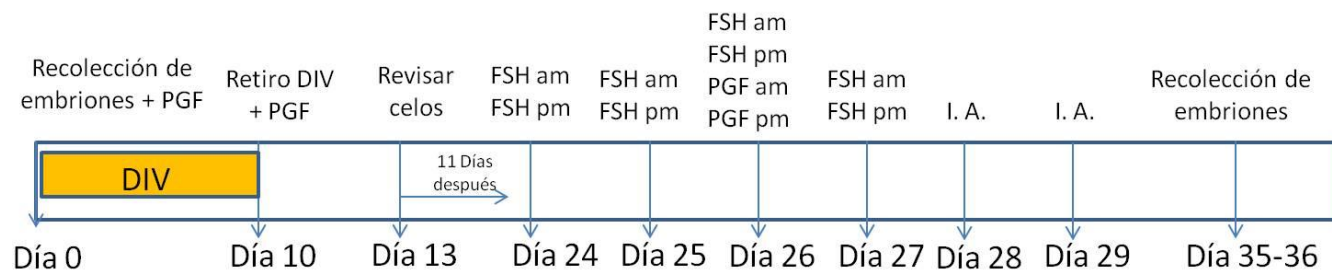


Figura 5. Protocolo de reciclado rápido de donadoras utilizado en vacas de la raza Criollo.

7. Inseminación artificial de las donadoras.

Al quinto día después de iniciado el protocolo de superovulación las vacas que recibieron los tratamientos fueron agrupadas en el mismo corral, con el fin de realizar la detección de estros, fueron evaluadas en las primeras y últimas horas del día que es donde los estros suelen manifestarse mejor, se utilizó semen del mismo toro siempre para la misma vaca durante los tres distintos periodos. Se le dieron 3 inseminaciones a cada unidad experimental a las 12, 24 y 36 horas después de detectado el estro.

8. Mediciones de variables antes de la colección de embriones.

Antes de comenzar la colección de embriones, se realizó la medición de las variables que se utilizaron en el análisis estadístico. Se escanearon los ovarios con ultrasonido para hacer el conteo de cuerpos lúteos presentes en cada ovario, se tomaron medidas del largo, ancho y profundo del ovario para estimar su volumen. Se evaluó la condición corporal y se tomó una muestra de sangre de los vasos caudales, posteriormente fue centrifugada para obtener el suero, el cual, fue congelado para posteriormente determinar la cantidad de progesterona circulante al día 7 post estro, por radioinmunoanálisis. Se utilizó un kit comercial para análisis de progesterona (DPC, Los Angeles C.A.) con una sensibilidad de 0.03 ng/ml, y coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo de 4.5% y 8.8% respectivamente.

9. Procedimientos previos a la colección de embriones.

Las donadoras fueron colocadas en una trampa inmovilizadora; se lavó y, desinfectó el área perivulvar y coccígea dorsal y se aplicaron entre 5 y 8 ml de Lidocaína al 2% por vía epidural; se aplicó Xilazina al 2% en dosis tranquilizante cuando fue necesario; se evacuó el recto y se realizaron las mediciones mencionadas en el párrafo anterior. Se insertó una sonda Foley de 2 vías por vía vagino-rectal, fijándola en el cuerpo del útero, para realizar las infusiones-

coleciones uterinas; se utilizaron 1.5 litros de solución amortiguadora de fosfatos , suplementada con glucosa, piruvato, antibióticos y 0.3% de alcohol polivinílico (PBSm) (Dulbecco y Vogt, 1954).

10. Medio usado para la colección de embriones.

Se utilizó PBSm suplementado con 0.5% de albúmina sérica bovina en lugar del alcohol polivinílico. Todos los medios (infusiones, manejo y congelación) fueron producidos en el laboratorio acuático-pecuario del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP.

11. Colección embrionaria.

Se seleccionó la sonda Foley de dos vías, dependiendo del tamaño del útero; posteriormente se lubricó la sonda Foley con PBSm y se le introdujo un estilete para darle rigidez; se insertó la sonda Foley en el cuerpo del útero y se fijó mediante el inflado del balón que para tal efecto tiene la sonda, en la porción del cuerpo uterino mas caudal, para poder infundir los dos cuernos al mismo tiempo. Se introdujeron de 50 a 100 ml de PBSm, dependiendo del tamaño del útero, se cerró el sistema y se dio masaje cuidadoso pero firme a los cuernos uterinos; se abrió el sistema hacia el filtro y se exprimió el útero hasta vaciarlo del medio que se infundió, se repitió este procedimiento hasta terminar el 1.5 L de PBSm. Una vez terminada la colección, se retiró la sonda Foley, se aplicó prostaglandina F_{2α} a la donadora y un dispositivo intavaginal con progesterona. El filtro se desconectó del sistema de mangueras, cuidando en todo momento que tuviera medio y se llevó al laboratorio para la búsqueda de los embriones.

12. Búsqueda y evaluación de embriones.

Se vació el contenido del filtro en una caja petri cuadrada de 100 x 100 mm, con fondo cuadrículado para la búsqueda de embriones en el microscopio con un aumento de 20 a 30x; se enjuagó la malla del filtro con PBSm, usando una jeringa

sin émbolo de hule y una aguja calibre 19 a presión para retirar el moco adherido a la malla. Se preparó una caja petri de 35 mm con solución de mantenimiento (PBSm con albúmina sérica bovina) para colocar los embriones que se fueron encontrando. Los embriones encontrados fueron enjuagados en varias gotas de medio para retirar cualquier partícula, antes de ser evaluados.

La evaluación morfológica se realizó según los criterios descritos en el manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones (IETS, 2007), los embriones fueron catalogados de acuerdo a su estadio de desarrollo, nombrándoles del 1 (estadio de una célula) al 9 (estadio de blastocito eclosionado), y según su calidad: excelente (1), bueno (2), regular (3) y degenerado (4). Una vez que fue realizado el diagnóstico morfológico y determinado aquellos embriones capaces de proseguir su desarrollo, se procedió a criopreservarlos.

13. Criopreservación de embriones con fines de conservación de recursos genéticos.

El alcance del presente trabajo no incluye la criopreservación de los embriones; sin embargo, al ser la conservación de los embriones como recurso genético uno de los objetivos primordiales del proyecto que respalda esta investigación, se menciona brevemente la metodología de dicho proceso.

Los embriones en estadio de mórula y blastocito con calidades 1 y 2 fueron puestos en medio de mantenimiento con etilén glicol al 10% y 0.3 M de sacarosa y empajillados. Posteriormente fueron puestos en una congeladora automática, la cual descendió la temperatura de manera gradual y automática desde la temperatura ambiente hasta llegar a los -6°C , a una tasa de $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$; a esta temperatura se sembró la cristalización para lograr un congelamiento uniforme en la parte donde se localizaba el embrión; la temperatura siguió entonces descendiendo a una tasa de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta llegar a los -35°C y una vez a esta

temperatura se pasaron directo al tanque de nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cabe mencionar que estos embriones formaran parte de la colección de germoplasma de la raza criollo Coreño y junto con dosis de semen, está depositada en el Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP.

14. Diseño experimental.

El diseño experimental utilizado fue un Crossover Simple Balanceado con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + T_k + \epsilon_{ijk}$$

En donde Y_{ijk} : es la k-ésima observación de la variable de respuesta,

μ : Media general,

α_i : Efecto del i – ésimo sujeto ($i = 1, 2 \dots 6$ o 12),

β_j : Efecto del j – ésimo período ($j = 1, 2$ y 3),

T_k : Efecto del k - ésimo tratamiento ($k = 1, 2$ y 3),

ϵ_{ijk} : Error experimental distribuido NI ($0, \sigma\epsilon^2$).

15. Variables de respuesta.

Las variables de respuesta que se evaluaron fueron; número de embriones transferibles (E. Transf), número de corpúsculos recuperados (embriones + óvulos no fertilizados) (Corp. Recup), número de embriones no transferibles (E. No Transf), número de cuerpos lúteos (CL), número de óvulos no fertilizados (ONF), volumen ovárico (VO), concentración sérica de progesterona (P4), porcentaje de fertilización (% Ferti), porcentaje de vacas que por lo menos produjeron 1 embrión (P1ET) y porcentaje de recuperación (%PR).

16. Transformaciones de datos.

Los datos fueron analizados con el procedimiento de Modelos Lineales Generalizados (PROC GLM) del paquete estadístico SAS (2002). Considerando la distribución probabilística de las variables categóricas en estudio se realizaron transformaciones de los valores de respuesta de estas variables (E. Transf, Corp. Recup, E. No Transf, CL, ONF). Las transformaciones realizadas fueron: obtener la raíz cuadrada de los valores (\sqrt{y}); obtener la raíz cuadrada de los valores sumándole .5 ($\sqrt{y+0.5}$) y obtener el arcoseno de la raíz cuadrada de los valores ($\text{Acsin}\sqrt{y}$) de acuerdo a lo propuesto por Lentner, (1993). Lo anterior para validar los supuestos que se requieren para utilizar adecuadamente el PROC GLM, sin embargo, los valores de respuesta transformados no fueron útiles para los análisis estadísticos por la escala de estos, lo que se reflejó en un sistema de ecuaciones sin solución (soluciones que tendían al infinito). Considerando lo expuesto previamente, los análisis finales se realizaron utilizando los valores de respuesta originales puesto que existen estudios que mencionan diferencias mínimas al comparar modelos lineales y no lineales en la estimación de parámetros generados al analizar una misma característica como continua o discreta (Weller *et al.*, 1988; Olesen *et al.*, 1994; Matos *et al.*, 1997). Cuando se tuvo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) se realizó la prueba de Tukey para identificar las variables que diferían en contraste con los efectos fijos de periodo, vaca y tratamiento.

Se realizó un análisis en donde se conjuntaron todos los animales para buscar diferencias entre vacas y vaquillas, sin embargo es necesario mencionar que para agrupar los animales se tomaron en cuenta solo 3 periodos, cuando en realidad fueron 6 por lo tanto se debe tener en cuenta esta consideración y los resultados se muestran como dos experimentos diferentes.

Se realizó un análisis de correlación de las variables; número de cuerpos lúteos (CL) y volumen ovárico (VO) sobre la variable concentración sérica de

progesterona (P4), utilizando el procedimiento correlación (corr) del paquete estadístico SAS.

Para evaluar la eficiencia de fertilización de los óvulos y recuperación se realizó un análisis con el procedimiento GLM, donde se incluyeron los efectos fijos de tratamiento, periodo y vaca sobre los porcentajes de fertilización y recuperación obtenidos en cada recolección, tanto en vacas como en vaquillas. Para obtener los porcentajes de fertilización se realizó una ecuación aritmética, multiplicando el número de embriones colectados (transferibles y no transferibles) por cien y posteriormente dividiendo el resultado entre el número de corpúsculos totales. Para el caso de recuperación se calculó de manera similar, solo que aquí se utilizó el número total de cuerpos lúteos y los corpúsculos totales. En el porcentaje de vacas que produjeron 1 embrión, solo se calculó el porcentaje de las vacas que tuvieron por lo menos un embrión por cada periodo y tratamiento.

17. Orden y asignación de tratamientos a unidades experimentales.

El orden y forma en el que se asignaron los tratamientos 1, 2, y 3 a las unidades experimentales se muestra en las tablas N° 2 y N° 3.

Tabla 2. Asignación de tratamientos 1, 2, y 3 durante los periodos I, II, y III a las unidades experimentales (vacas).

Toro	Número de vaca	Periodo I	Periodo II	Periodo III
6910	4544	1	2	3
7702	8602	1	2	3
6910	1559	2	1	3
7702	5630	2	1	3
6910	1546	3	2	1
7702	7531	3	2	1
6903	2088	1	3	2
6903	4534	1	3	2
6903	4537	2	3	1
6910	4548	2	3	1
6910	7556	3	1	2
6910	8513	3	1	2

Tabla 3. Asignación de tratamientos 1, 2, y 3 durante los periodos I, II, y III a las unidades experimentales (vaquillas).

Toro	Número de vaquilla	Periodo I	Periodo II	Periodo III
Cora	0510	1	2	3
Cora	1011	2	3	1
Cora	0521	3	1	2
Cora	1014	1	2	3
Xalisca	1013	2	3	1
Xalisca	1035	3	1	2
Xalisca	1015	1	2	3

VII. RESULTADOS.

El 44% de las vacas y el 52 % de las vaquillas produjeron al menos un embrión transferible y el 8% de las vacas y 26% de las vaquillas donadoras no presentaron respuesta superovulatoria a las gonadotropinas exógenas, en el 8% de las vacas y el 42% de las vaquillas no se recuperó estructura alguna.

El 33% de las vacas y el 33% de vaquillas produjeron embriones transferibles durante dos periodos distintos y el 50% de las vacas y 33% de vaquillas sólo produjeron embriones transferibles en un periodo, por último, un 8% de las vacas y un 16% de vaquillas no produjo ningún embrión transferible durante los tres periodos.

Experimento 1.

En el efecto fijo de tratamiento, solo se encontraron diferencias estadísticas significativas en las variables corpúsculos recuperados y óvulos no fertilizados ($P < 0.05$), el resto de las variables evaluadas no presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). En la tabla N° 4 se muestran las medias de cuadrados mínimos para las diferentes variables.

En el efecto fijo de periodo, se encontraron diferencias estadísticas significativas en las variables CL y P4 ($P < 0.05$), para el resto de las variables no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). En la tabla N° 5 se presentan las medias de cuadrados mínimos por periodo para las diferentes variables evaluadas.

En el efecto fijo vaca, se encontraron diferencias estadísticas significativas para las variables ONF y VO ($P < 0.05$), en el resto de las variables evaluadas no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), sin embargo en las diferentes unidades experimentales se encontró una gran variabilidad en las respuestas evaluadas lo cual indica una importante variación individual. Los

rangos del promedio de las respuestas por unidad experimental se muestran en la tabla N° 6.

Tabla 4. Medias de cuadrados mínimos, error estándar y porcentajes de animales que al menos produjeron 1 embrión transferible para cada tratamiento en experimento con vacas.

Variable evaluada	T1	T2	T3
E. Transf.	1.16±0.71 ^a	2.91±0.71 ^a	1.08±0.71 ^a
Corp. Recup.	10.33±1.69 ^a	7.16±1.69 ^{ab}	4±1.69 ^b
E. No Transf.	2.0±0.50 ^a	1.83±0.50 ^a	.83±0.50 ^a
CL	10.41±0.74 ^a	9.08±0.74 ^a	8.75±0.74 ^a
ONF	7.25±1.60 ^a	2.41±1.60 ^{ab}	2.08±1.60 ^b
VO (cm ³)	14.75±1.50 ^a	11.77±1.50 ^a	11.01±1.50 ^a
P4 (ng/ml)	11.73±1.77 ^a	8.74±1.77 ^a	7.70±1.77 ^a
%Ferti (%)	44.60±10.38 ^a	52.52±11.91 ^a	36.95±11.14 ^a
%PR (%)	79.39±11.70 ^a	57.13±11.70 ^a	43.56±11.70 ^a
P1ET (%)	50	58	33

^{abc}Diferentes literales en el mismo renglón denotan diferencias estadísticas significativas (P<0.05) .

Tabla 5. Medias de cuadrados mínimos, error estándar y porcentajes de animales que al menos produjeron 1 embrión transferible para cada periodo en experimento con vacas.

Variable evaluada	P1	P2	P3
E. Transf.	2.41±0.71 ^a	1.58±0.71 ^a	1.16±0.71 ^a
Corp. Recup.	6.33±1.69 ^a	9.58±1.69 ^a	5.58±1.69 ^a
E. No Transf.	1.16±0.50 ^a	2.0±0.50 ^a	1.58±0.50 ^a
CL	7.83±0.74 ^a	9.91±0.74 ^{ab}	10.5±0.74 ^b
ONF	2.91±1.59 ^a	6.0±1.59 ^a	2.83±1.59 ^a
VO (cm ³)	11.49±1.50 ^a	11.08±1.50 ^a	14.97±1.50 ^a
P4 (ng/ml)	5.20±1.77 ^a	11.01±1.77 ^{ab}	11.95±1.77 ^b
%Ferti (%)	32.11±10.38 ^a	53.14±11.14 ^a	48.82±11.91 ^a
%PR (%)	56.83±11.70 ^a	80.68±11.70 ^a	42.56±11.70 ^a
P1ET (%)	41	58	41

^{abc}Diferentes literales en el mismo renglón denotan diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Tabla 6. Rangos en las medias de cuadrados mínimos y error estándar en el efecto vaca, en las variables evaluadas.

Variable evaluada	Rangos de medias por unidad experimental	Error estandar
E. Transf.	0.0 - 5.0	1.42
Corp. Recup.	1.33 - 17.67	3.38
E. No Transf.	0.0 - 7.0	1.0
CL	6.33 - 12.66	1.49
ONF	0.33 - 13.33	3.19
VO (cm ³)	5.77 - 31.22	3.0
P4 (ng/ml)	1.75 - 18.61	3.55

Experimento 2.

Tanto para el efecto fijo de tratamiento y periodo no se encontraron diferencias estadísticas significativas, para ninguna de las variables evaluadas. La variable óvulos no fertilizados, no se pudo analizar debido a que faltaron observaciones en algunas celdas. La variable volumen ovárico no fue estimable para el periodo 1, ya que no se pudo realizar la evaluación en el citado periodo.

En este experimento, se encontró una respuesta más baja a la superovulación comparado con el experimento 1, sin embargo, el porcentaje general de fertilización con vaquillas fue de 93.08%, más del doble de lo que se obtuvo con las vacas.

En las tablas N° 7 y N° 8 se muestran las medias de cuadrados mínimos para el efecto de tratamiento y periodo y en la tabla N° 9 se muestra los rangos de los promedios por unidad experimental.

Por último se encontró una correlación positiva entre el número de cuerpos lúteos y niveles de progesterona, donde aquellos animales que tenían mayor número de cuerpos lúteos presentaron niveles de progesterona más altos ($P < 0.05$). De la misma forma aquellos animales que tenían un mayor volumen ovárico presentaron mayor producción de progesterona ($P < 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticas significativas en los porcentajes de fertilización, en ninguno de los efectos fijos.

Tabla 7. Medias de cuadrados mínimos, error estándar y porcentajes de animales que al menos produjeron 1 embrión transferible para cada tratamiento en experimento con vaquillas.

Variable Evaluada	T1	T2	T3
E. Transf.	2.33±0.94 ^a	1.83±0.94 ^a	1.66±0.94 ^a
Corp. Recup.	3.83±1.14 ^a	2.33±1.14 ^a	2.0±1.14 ^a
E. No Transf.	1.33±0.56 ^a	0.33±0.56 ^a	0.16±0.56 ^a
CL	5.83±1.11 ^a	5.50±1.11 ^a	4.50±1.11 ^a
ONF	ne	ne	ne
VO (cm ³)	2.94±0.45 ^a	3.56±0.45 ^a	1.92±0.45 ^a
P4 (ng/ml)	9.05±2.32 ^a	6.72±2.32 ^a	5.04±2.32 ^a
%Ferti (%)	96.50±3.75 a	95.66±3.46 a	97.33±3.84 a
%PR (%)	50.23±14.40a	32.14±14.40a	40.27±14.40 a
P1ET (%)	50	50	50

^aNo hubo diferencias estadísticas significativas (P>0.05).

^{ne}El valor de ONF no fue estimable por los escasos datos obtenidos.

Tabla 8. Medias de cuadrados mínimos y error estándar para cada periodo en vaquillas.

Variable Evaluada	Periodo 1	Periodo 2	Periodo 3
E. Transf.	1.16±0.94 ^a	2.66±0.94 ^a	2.0±0.94 ^a
Corp. Recup.	2.5±1.14 ^a	3.0±1.14 ^a	2.66±1.14 ^a
E. No Transf.	1.16±0.56 ^a	0.16±0.56 ^a	0.50±0.56 ^a
CL	3.83±1.11 ^a	5.83±1.11 ^a	6.16±1.11 ^a
ONF	ne	ne	ne
VO (cm ³)	ne	3.44±0.33 ^a	2.18±0.33 ^a
P4 (ng/ml)	7.47±2.32 ^a	8.07±2.32 ^a	5.28±2.32 ^a
%Ferti (%)	94±4.86 a	94±3.84 a	94.83±3.27 a
%PR (%)	34.72±14.40a	37.59±14.40a	50.33±14.40 a
P1ET (%)	33	50	66

^aNo hubo diferencias estadísticas significativas (P>0.05).

^{ne}El valor de ONF no fue estimable por los escasos datos obtenidos.

Tabla 9. Rangos en las medias de cuadrados mínimos y error estándar en el efecto vaquilla, en las variables evaluadas.

Variable evaluada	Rangos de medias por unidad experimental	Error estandar
E. Transf.	0.0 - 3.66	1.32
Corp. Recup.	0.0- 6.66	1.61
E. No Transf.	0.0 - 2.33	0.80
CL	2.0 - 8.66	1.57
ONF	Ne	ne
VO (cm ³)	0.78 - 4.66	0.60
P4 (ng/ml)	0.55 - 21.62	3.28

^{ne}El valor de ONF no fue estimable por los escasos datos obtenidos.

VIII. DISCUSION

En el experimento 1, se observó un comportamiento descendente en la variable Corp Recup a medida que disminuyó la dosis de FSH, siendo mayor la respuesta con la dosis mas alta contra la dosis mas baja, con un valor intermedio en la dosis intermedia ($P < 0.05$); sin embargo, la dosis mayor de FSH resultó en un mayor número de ONF con respecto a la dosis mas baja ($P < 0.05$); sin embargo, al analizar los porcentajes de fertilización en los corpúsculos recuperados, no se encontraron diferencias entre tratamientos ($P > 0.1$). No se encontraron diferencias entre dosis para las demás variables de respuesta medidas. Lo anterior indica que las dosis reducidas, tomando como una dosis normal la de uso generalizado en ganado de carne (280 Mg) no promueven una mayor respuesta superovulatoria, resultando incluso detrimentales en términos de corpúsculos (embriones + óvulos) recuperados. La cantidad de corpúsculos recuperados en este experimento se encuentra en valores normales con respecto a otros trabajos, siendo similar a lo encontrado por otros investigadores en *Bos taurus* y *Bos indicus* que utilizaron dosis comerciales (Hasler, 2006, Baruselli *et al.*, 2006).

El haber obtenido una alta proporción de ONF con respecto a los corpúsculos totales recuperados en el T1, en los T2 y T3 no fue tan alto, puede atribuirse a la edad de las donadoras, que en promedio tenían 12.4 ± 2.93 años, y algunos autores señalan que la producción de embriones decrece después de los 8 años de edad (Matthiesen 2011), aunque sin presentar disminución en la tasa ovulatoria; lo anterior por una disminución en la tasa de fertilización y la calidad de los embriones (Donaldson 1984). Aunque no se analizó estadísticamente, se encontró que las donadoras que tenían entre 9 y 12 años de edad tuvieron una tasa de fertilización del 49%, mientras aquellas que tenían de 14 a 17 años solo tuvieron el 27% de fertilización.

Aun cuando no se realizaron evaluaciones fisiológicas para determinar la causa de las bajas tasas de fertilización en los animales de edad avanzada de este estudio, otros autores han estudiado mas a fondo las causas de la baja tasa de fertilización

en animales superovulados de edad avanzada; así, Breuel y colaboradores encontraron que las donadoras de edad avanzada presentan cambios en los perfiles hormonales; la FSH y el estradiol aumentan sus niveles séricos en valores no fisiológicos, provocando fallas en la maduración y crecimiento del folículos, comprometiendo la ovulación, la fertilización y el adecuado desarrollo embrionario (Breuel *et al.*, 1991).

Por otro lado, además de los cambios endocrinos, se ha encontrado que el número de ovocitos, se limita conforme avanza la edad en los bovinos. En un estudio, donde se utilizó aspiración transvaginal de ovocitos (ATVO), se encontró que hembras mayores de 9 años, experimentaron una disminución en el número de ovocitos recuperados en el proceso de aspirado (Hasler, 2003).

Algunos autores han encontrado que la competencia para el desarrollo y maduración del ovocito se limita cuando aumenta la edad en los bovinos y con esto disminuye su capacidad de ser fertilizados (Yamamoto *et al.*, 2010). En un estudio realizado en el 2011, se muestran resultados de ATVO en diferentes razas y diferentes edades, reportando que los animales jóvenes tienen un mayor porcentaje de blastocitos (32.5% en vaquillas vs 22.8% vacas) comparada con vacas de mayor edad; en animales cruzados de Murrah con Brahamann, se encontró un patrón similar (Su *et al.*, 2012); en vaquillas de 12 meses de edad el porcentaje de blastocitos fue de 45.9%, en vacas entre 7 y 8 años fue de 30.2% y en vacas mayores de 15 años, de 13.5% (Matthiesen, 2011).

Yamamoto y colaboradores en 2010, reportaron que en animales de mayor edad, se encontraron menores tasas de fertilización comparado con animales más jóvenes. Estos autores encontraron que las uniones GAP del ovocito y las células del cummulus desaparecían más rápido en animales longevos que en los jóvenes, provocando una progresión prematura de la división meiótica, por lo cual sugieren que la capacidad de fecundación de ovocitos de vacas de mayor edad es baja (Yamamoto *et al.*, 2010).

En trabajos realizados con bovinos criollo mexicano, se encontró que la ovulación ocurre después de 40 horas de iniciado el estro (Quezada *et al.*, 2014, Zárate 2008), por lo cual se podría inferir de que las inseminaciones se realizaron muy temprano y por eso se obtuvieron bajas tasas de fertilización; sin embargo, en animales que son sometidos a protocolos de superovulación, las ovulaciones suelen ocurrir más temprano, debido a que se presenta una mayor cantidad de folículos dominantes y aceleran la aparición del pico pre-ovulatoria de LH (Seidel *et al.*, 2003). Además para evitar la posibilidad de inseminaciones tempranas, se tomó la determinación de realizar tres servicios de inseminación artificial a las 12, 24 y 36 horas después del celo, por lo que se descarta esa posible causa de baja tasa de fertilización, diferente a la previamente discutida de la edad de las donadoras.

Los resultados de los análisis para el efecto de periodo arrojaron que solo hubo diferencias entre periodos en las variables CL y P4 ($P < 0.05$). Se encontraron valores menores en el periodo 1 para CL, así mismo, los niveles de P4 fueron menores en ese periodo. Un estudio demostró que a mayor cantidad de CL se incrementan los niveles de P4, debido a que las células lúteas son las encargadas de sintetizar y secretar la P4 (Aké *et al.*, 1999). Las diferencias entre los periodos, sugiere que las donadoras se adaptaron al manejo y confinamiento, con lo que disminuyeron los niveles de estrés que pudo provocar la disminución de estas variables en el periodo 1. Un estudio con hembras criollo, encontró que se adaptaron a manejo de destete temporal y prolongaron la aparición del comportamiento agresivo (Zárate, 2008). Las situaciones de estrés provocan que se incrementen los niveles de cortisol circulante y este a su vez provoca disminución de la tasa ovulatoria y suprime la secreción de gonadotropinas (Edwards *et al.*, 1987).

Por otro lado, se mejoró la condición corporal de la donadoras conforme transcurrió el estudio; en el experimento 1, iniciaron con 5.83 ± 0.57 puntos de

condición corporal y finalizaron con 6.41 ± 0.66 , en el experimento 2 iniciaron con 6 ± 0 puntos de condición corporal y terminaron con 6.42 ± 0.53 . La limitación de nutrientes, resulta en la disminución de concentraciones séricas de estradiol, provocando fallas en la ovulación, al disminuir la frecuencia y la amplitud de los pulsos de LH (Henricks *et al.*, 1986).

En el efecto vaca se encontraron diferencias estadísticas significativas en las variables E. No Transf, ONF y VO. Estas diferencias pueden estar asociadas a factores intrínsecos y que son inherentes a cada donadora, ya que presentan una importante variación individual. Existen trabajos que mencionan que es difícil la predicción de resultados en la superovulación, incluso en aquellos animales que en colecciones previas han respondido de manera favorable, por lo que la respuesta de una vaca a la superovulación no se puede utilizar como un indicador para predecir su comportamiento en superovulaciones futuras (De La Torre *et al.*, 1992).

En el experimento 2, los resultados de los análisis estadísticos para los efectos de tratamiento y periodo no arrojaron diferencias estadísticas significativas, en ninguna de las variables evaluadas. Para el efecto vaquilla se encontraron diferencias significativas en la variable P4, pero al igual que las vacas del experimento 1, se encontró una variación individual alta.

Los experimentos 1 y 2 se realizaron en diferente tiempo e involucraron diferente número de animales y aunque el diseño experimental fue el mismo, no es posible hacer comparaciones estadísticas entre los dos trabajos; sin embargo, se hacen algunas precisiones importantes a considerar relacionadas con la edad de la donadora. Aunque la respuesta ovulatoria en las vaquillas fue menor que en las vacas, las estructuras recuperadas fueron en su mayoría embriones transferibles y no transferibles, por lo que la respuesta en términos de producción embrionaria se empareja con la de las vacas. Esto sin duda es favorecido por la edad de las donadoras, como se mencionó en la discusión del experimento 1. Existe mejor

desarrollo y competencia de los ovocitos en animales jóvenes (Matthiesen, 2011, Yomamoto *et al.*, 2010), Lo que se traduce en mayor fertilidad, tal como lo reporta Bodmer en el 2005, cuando comparó la fertilidad entre vacas y vaquillas utilizando semen sexado, donde encontró mejores tasas de fertilidad en animales jóvenes (59.3 vs 28.1) (Bodmer *et al.*, 2005)

En vaquillas (experimento 2) en la variable VO, se encontraron valores menores que en las vacas (experimento 1) realizó. Así mismo, los valores para número de CL's y concentraciones séricas de P4 fueron menores en las vaquillas comparado con las vacas. Se ha publicado que en animales jóvenes y de talla pequeña, cuando son sometidos a protocolos de superovulación, se puede presentar una sobre estimulación ovárica. Este fenómeno propicia una disminución en el número de ovulaciones, cuerpos lúteos y P4, lo cual ocurre por la incapacidad física y falta de espacio para albergar a todos los folículos en crecimiento en el ovario, los folículos sufren hipoxia, limitan su crecimiento y sufren atresia. Por otro lado se postula que animales jóvenes superovulados tienen fallas endocrinas por las grandes cantidades de estradiol circulante, provocando una baja respuesta a la superovulación (Lerner *et al.*, 1986).

En el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los dos experimentos para la variable Embriones Transferibles con el efecto tratamiento, teniendo una media general para vacas de 1.72 ± 2.63 y para vaquillas de 1.94 ± 2.29 ET. Según la literatura, la cantidad de Embriones Transferibles que se producen en razas criollas ó nativas, es más bajo que lo que se encuentra en animales *Bos taurus* y *Bos indicus* (Hasler, 2006, Baruselli *et al.*, 2006). Una posible causa de lo anterior es que en los animales criollo, la selección ha sido orientada de manera esencialmente natural hacia la sobrevivencia en ambientes adversos y sin fines de producción intensiva. Algunos autores han encontrado que cuando se hace selección en favor de características productivas, el desempeño reproductivo de la descendencia mejora. (Forni y Albuquerque, 2005, Martin *et al.*, 1992). En un estudio reciente, donde se utilizaron dosis

reducidas en bovinos criollos lecheros tropicales en México, el autor concluye que no se presentaron diferencias al utilizar la dosis reducida (210 mg) vs alta (260 mg). (Rosales, 2013). Se encontró una media mayor de embriones transferibles a la de este estudio (3.1 vs 1.72 ± 0.63 y 1.94 ± 2.29), sin embargo, los bovinos de esos hatos han estado sometidos a selección para mejorar la producción de leche, lo cual hace pensar que pudiera esto tener efecto en el número de embriones transferibles. Ahora que si se compara con la media comercial mundial para *Bos taurus* (4.8 embriones transfereibles), sigue siendo bajo (Hasler, 2003).

En un trabajo en el que se utilizaron una raza compuesta con ganado nativo (Nativo Thai, Brahaman y Charolais), se encontraron elevadas respuestas a la superovulación, en vaquillas y vacas con una dosis reducida de FSH (200 mg). Los autores obtuvieron 9.75 ± 3.01 y 8.50 ± 3.48 Embriones Transferibles, respectivamente para vacas y vaquillas (Nilchuen *et al.*, 2012). Estos resultados son superiores a los del presente estudio y a la media comercial para bovinos carne, y pueden estar influenciados por el hecho de que se están utilizando animales cruzados que expresan vigor híbrido. Esto está en consonancia con lo reportado por Martínez y colaboradores, que al evaluar parámetros reproductivos de vacas criollo coreño, Guzerat y sus cruzas, encontraron mejor comportamiento reproductivo en las cruzas que en las razas puras (Martínez *et al.*, 2006).

En una raza nativa de la sub especie *Bos indicus*, con dosis reducidas de FSH (120, 160 y 200 mg; Barati *et al.*, 2006) se encontró una media de E Transf de 3 lo cual es mayor que la del presente estudio (1.72 ± 2.63 en vaca y 1.94 ± 2.29 en vaquillas), y similar a la del criollo lechero tropical, según resultados con *Bos indicus*, se encuentra debajo de la media de los de su especie, posiblemente por lo mencionado anteriormente sobre la escasa selección que se aplica a las razas nativas o localmente adaptadas, no se encontró efecto de dosis para Embriones Transferibles en el trabajo de Barati *et al.* (2006).

En animales Japanese Black, que es una raza ampliamente difundida en Japón, pero que no es transfronteriza y donde se ha aplicado selección para cualidades de la carne pero no para producción intensiva, se utilizaron dosis reducidas de FSH (16 y 24 mg), obteniendo 4.6 ± 5.2 y 4.4 ± 3.7 Embriones Transferibles con dosis baja y alta respectivamente, demostrando que uso de dosis reducidas es viable (Sugano y Watanabe, 1997), cabe mencionar que los promedios de este trabajo son similares a los reportados en otras razas *Bos taurus* (Hasler, 2003), y mayores a los que se obtuvieron en este estudio.

En otro estudio en el que se evaluó la respuesta a la superovulación en hembras nativas de Corea, utilizando dosis reducidas de FSH cruda (28 y 24 mg), éstas produjeron 3.4 ± 0.8 y 3.2 ± 0.7 Embriones Transferibles con las dosis mencionadas, respectivamente, no encontrando diferencias en la producción de embriones al utilizar una dosis u otra (Son *et al.*, 2007). En Colombia se utilizaron dosis reducidas de FSH en diferentes razas criollas, obteniendo una media menor de Embriones Transferibles a la encontrada en el presente estudio (1.43). Estos autores encontraron diferencias entre las diferentes razas criollas colombianas, aunque ninguna produjo más de 3 Embriones Transferibles, teniendo rangos de 0.7 a 2.8 embriones transferibles con dosis alta (36 mg) y 0 y 3 Embriones Transferibles con dosis baja (24 mg), y concluyendo que no existen diferencias al utilizar dosis reducidas, y que existen múltiples factores que pueden afectar la respuesta a la SO, independientemente de la dosis (Estrada *et al.*, 1998).

Resumiendo, la literatura muestra que las razas criollas presentan una pobre respuesta a la SO; la media de Embriones Transferibles que se obtiene de estas razas suele ser más baja a lo que se obtiene en otras razas *Bos taurus* y *Bos indicus* (Hasler, 2006, Baruselli *et al.*, 2006). En los estudios que se han realizado para evaluar dosis reducidas en estas razas de bovinos, los autores coinciden que no existen diferencias en la respuesta al SO, con menores cantidades de FSH (Estrada *et al.*, 1998, Son *et al.*, 2007, Sugano y Watanabe, 1997, Barati *et al.*, 2006, Nilchen *et al.*, 2012). Es importante mencionar que el hecho de que no

exista diferencia entre tratamientos, da una ventaja en la reducción de los costos en los tratamientos de superovulación, ya se puede disminuir la cantidad de FSH por mitad, sin tener efectos negativos en la respuesta a la superovulación y producción embrionaria.

Aparentemente, otros factores son los que pudieran limitar la producción de embriones transferibles en razas nativas y localmente adaptadas. La mayoría de las razas locales incluyendo la Criollo Coreño, son animales de talla chica, lo cual nos indica que pueden responder adecuadamente a menores dosis de FSH. Trabajos en caprinos, muestran que es necesario incrementar la dosis de FSH, conforme se incrementa el peso corporal (Rahman *et al.*, 2014). Otro trabajo en bovinos indica que al aumentar la dosis de 400 mg de FSH, la producción de Embriones Transferibles decrece (Kanitz *et al.*, 2002).

Las dietas que consumen estas razas son con poca materia seca y generalmente limitadas en nutrientes, lo cual podría indicar que el metabolismo hepático en estas razas es bajo, lo cual puede contribuir a que se produzcan resultados aceptables con dosis reducidas de FSH, gracias a que se retrasa el metabolismo de esteroides sexuales como el estradiol y progesterona, a diferencia de lo que ocurre en bovinos altos productores de leche, en donde han encontrado que el aumento de la ingesta de materia seca, incrementa el metabolismo hepático, provocando fallas en la expresión y duración del estro, tiempo de la ovulación, y fallas en la ovulación; ocurre también una disminución de los niveles séricos de progesterona y estradiol, y en general todos estos factores limitan el desempeño reproductivo. (Chebel *et al.*, 2008, Wiltbank *et al.*, 2006, Leroy *et al.*, 2005 y Vasconcelos *et al.*, 2003).

En animales que no son sometidos a exigencias de producción altas como los criollo, no es necesario un aporte alto de nutrientes y se asume que no se producen estos cambios metabólicos y se evitan los efectos negativos en el desempeño reproductivo, que causan las altas ingestas de materia seca, y aunque

no se realizaron mediciones en nuestro estudio para comprobar esto, los antecedentes y la comparación parece ser apropiada.

Por último, las razas de bovinos criollo, han sido sub valoradas por considerarlas improductivas, lo cual las orilló a ser concentradas en zonas aisladas, de escasos recursos alimenticios y tecnológicos (De alba, 2011). Forman parte de sistemas de producción de traspatio, donde no se aplican programas de mejoramiento genético. Esto pudiera ocasionar que los animales tengan una baja producción de Embriones Transferibles, ya que no han sido seleccionados para ninguna característica reproductiva, a diferencia como ocurre en otras razas *Bos taurus* ó *Bos indicus*, que si presentan en general una mayor producción embrionaria, pero también han sido seleccionados genéticamente para mejorar sistemas de producción y entre las características que han modificado se encuentran los parámetros reproductivos (Hasler, 2006, Baruselli *et al.*, 2006).

IX. CONCLUSIONES.

No se encontraron diferencias en las tres dosis evaluadas en la mayoría de las variables de respuesta medidas, pero sobre todo en aquella que es relevante para el objetivo de la superovulación, que es la producción de Embriones Transferibles. Esto indica que cualquiera de las dosis evaluadas puede ser usada esperando resultados similares, con la ventaja en el costo del tratamiento para las dosis menores.

En general, la producción de embriones transferibles fue baja comparada con razas seleccionadas para alta producción, pero similar a lo que se ha obtenido con razas localmente adaptadas en otros países, lo que se postula es el resultado de la no selección en estos genotipos por desempeño reproductivo.

X. LITERATURA CITADA.

- Adams G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*. 41. 1994. 19-24.
- Adams G. P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69. 2008. 72-80.
- Adams GP, Pierson RA. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology* 43. 1995. 113–20.
- Aggarwal A., Upadhyay R. Heat Stress and Animal Productivity. Unidad 1. Introduction. Unidad 2. The thermoneutral zone. Editorial Springer. 2013
- Ake L. J. R., Alfaro G. M. E., Aguayo A. A. M., Holy L. Concentración plasmática de progesterona y producción embrionaria, en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales. *Veterinaria México*. 30. 1999. 19-23.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cytoskeleton. In: *Molecular biology of the cell* 4th ed. Artmed, 2004.
- Ali M. S., Khandoker M. A. M. Y., Afroz M. A., Bhuiyan K. F. H. Ovarian response to different dose levels of follicle stimulating hormone (FSH) in different genotypes of Bangladeshi cattle. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* Vol 25, N°1. 2012. 52- 58.
- Álvarez P., Spicer L. J., Chase Jr C. C., Payton M. E., Hamilton T. D., Stewart R. E., Hammond A. C., Olson T. A., Wettemann R. P. Ovarian endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci.* 78 : 1291-1302. 2000.
- Amstrong D. T. Recent advances in Superovulation of Cattle. *Theriogenology*. 39. 1993. 7- 24.
- Asociación de criadores de ganado Criollo Mexicano A. C. (ASOCRIOLLO) 2010. Memoria técnica de "Curso de acreditación de inspectores de ganado Criollo para registro" Chihuahua, Chihuahua. México.
- Barati F., Niasari-Naslaji A., Bolourchi M., Sarhaddi F., Razavi K., Naghzali E., Thatcher W. W. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology*. 66. 2006. 1149-1155.
- Barros C. M., Nogueira M. F. G. Embryo transfer in *Bos Indicus* Cattle. *Theriogenology*. 56. 2001 1483-1496.

Baruselli P. S., Sá Filho M. F., Martins C. M., Nasse L. F., Nogueira M. F. G., Barros. C M., Bó G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 65. 2006. 77-88.

Betteridge K.J. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Sciences*. 79. 2003. 203-244.

Biggers J. D. Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. *J. Repro. Fert.* 173-186. 1991.

Bó G.A, Baruselli P.S, Moreno D. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57. 2002. 53-72.

Bó GA, Adams GP, Pierson RA and Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43. 1995. 31-40.

Bó GA, Baruselli PS, Chesta P and Martins CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 65. 2006. 89-101.

Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H and Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57. 2002. 53-72.

Bó GA, Hockley DK, Nasser LF and Mapletoft RJ. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology* 42. 1994. 963-975.

Bó G. A., Carballo G. D., Tríbulo A., Tríbulo H., Tríbulo R., Mapletoft R. J. Nuevos tratamientos hormonales para la superovulación de donadoras de embriones bovinos. Memoria técnica del 8° Simposio Internacional de Reproducción Animal. 1-12. 2009.

Bodmer M., Janett F., Hassig M., den Daas N., Reichert P., Thun R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*. 64. 2005 (7). 1647 - 1655.

Breuel K. F., Baker R. D., Butcher R. L., Townsed E.C., Inskeep E. K., Dailey R. A., Lerner S. P. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating

hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*. 36. 1991. 241-255.

Brito N. V., Dantas R., Leite J. V., Arranz J. J., Bayón Y., San Primitivo F. Portuguese Cachena cattle: a socio-economic, morphological and productive characterization of an endangered breed. *Boletín de información sobre recursos genéticos animales*. FAO. 37. 2005. 1 - 8.

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

Carlsson B, Nilsson A, Isaksson OGP, Billig H. Growth hormone-receptor messenger RNA in the rat ovary: regulation and localization. *Mol Cell Endocrinology* 1993. 95. 59–66.

Chebel. R. C., Demétrio D. G. B., Metzger J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*. 69. 2008. 98-106.

Colazo M. G., Mapletoft R. J. Estado actual de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*. Vol. 9 N° 1. 2007.

Colazo MG, Gordon MB, Rajamahendran R, Mapletoft RJ and Ambrose DJ. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* 72. 2009. 262-270.

Conner S, Leaf D, Wessel G. Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. *Molecular Reproduction and Development* 48. 1997. 106–118.

Dawuda P. M., Scaramuzzi R. J., Leese H. J., Hall C. J., Peters A. R., Drew S. B., Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating cows. *Theriogenology*. 58. 2002. 1443-1455.

De Alba M. J. El libro de los Bovinos Criollos de América. Ediciones Papiro Omega. S. A de C. V. 2011. P. 16, 17, 77-80, 205-210, 40-415.

De La Torre S. J. F., Castro L. M. A., González P. E., Reynoso C. O. Respuesta de vacas Cebú a superovulaciones sucesivas con FSH. *Técnica Pecuaria*. Vol 30. N°3 1992. 223-231.

De Renis F., Scaramuzzi R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow. A review. *Theriogenology*. 60. 2003. 1139-1151.

Díaz T., Manzo J., Trocóniz N., Benacchio., Verde O. Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein and Brahman cows. Carora Type and cross-bred heifers. *Theriogenology*. 26. 1986. 419- 432.

Donaldson, L. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology* 21. 1984. 1013-1018.

Dong Xuan D. T., Szalay I., Su V.V., Tieu H. V., Dang Vang N. Animal genetic resources and traditional farming in Vietnam. *Boletín de información sobre recursos genéticos animales*. FAO. 2006. 38. 1-17.

Donovan G. A., Bennett F. L., Springer F. S. Factors associated with first service conception in artificially inseminated nulliparous Holstein heifers. *Theriogenology*. 60. 2003. 67-75.

Driancourt M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55. 2001. 1211-1239.

Dulbecco R., Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 1954. 31; 99 (2) :): 167-182.

Edwards L. M., Rahe C. H., Griffin J. L., Wolfe D. F., Marple D. N., Cummins K. A., Pitchett J. F. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated hereford heifers. *Theriogenology*. 28. 1987. 291-299.

Erickson BH. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J Reproduction and Fertility* 1996; 10. 97–105.

Estrada J. L., Pachón L. A., Olivera M., Piedrahita J., Westhusin M. Superovulatory response of colombian creole cattle to two doses of FSH. *Theriogenology*. Abstract. Vol. 49 Issue 1 Pag. 377. 1998.

Eversole D. E., Browne M F., Hall J. B., Dietz R. E. Body Condition Scoring Beef. Virginia Tech. 2009. Publication 400-791.

Ferreira E. M., Vireque A. A., Adona P. R., Meirelles F. V., Ferriani R. A., Navarro P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71. 2009. 836-848.

Figueiredo R. A., Barros C. M., Pinheiro IOL., Sole JMP., Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*. 47. 1997. 1489-1505.

Fina M., Casellas J., Tarrés J., Bartolomé J., Plaixats J., Such X., Jiménez N., Sánchez A., Piedrafita J. Characterisation and conservation programme of the Alberes cattle breed in Catalonia (Spain). *Boletín de información sobre recursos genéticos animales*. FAO. 2008. 43. 1-14.

Forni S., Albuquerque L. G. Estimates of genetics correlations between days to calving and reproductive and weight traits in Nelore cattle. *J. Anim. Sci.* 2005. 83: 1511-1515.

Galli C., Duchi R., Crotti P., Turini N., Ponderato S., Lagutina G., Lazzari. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 59. 2003. 599-616.

Ginther O. J., Bergfelt D. R., Beg M. A., Kot K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*. 64. 2001. 197-205.

Gonzalez A., Lussier T. D., Carruthers B. D., Mapletoft R. J. Superovulation of beef heifers with folltropin: A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*. 33. 1990. 519-529.

Gunter O. J., Knopf L., Kastelic J. P., Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 1989 87. 223-230.

Hansen P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science*. 82-83. 2004. 349-360.

Hasler J. F. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology*. 65. 2006. 4-16.

Hasler J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Sciences*. 79. 2003. 245-264.

Henricks, D.M., Rone, J.D., Ferrell, CL., Echternkamp, S.E. A note of the effect of nutrition on ovulation and ovarian follicular population in the individually fed postpartum beef heifers. *Anim. Prod.* 1986. 43. 557-560.

Hoffmann I., Scherf B. Implementing the Global Plan of Action for Animal Genetic Resources. *Recursos genéticos animales*. FAO. 2010. 47. 1-10.

Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H, et al. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *J Reproduction and Fertility*. 122. 2001. 21–30.

Hyttel P., Fair T., Callesen H., Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47. 1997. 23-32.

IETS Data retrieval committee report 2006. *Embryo Transfer Newsletter*, 2007; 15-20.

Jaiswal R. S., Singh J., Marshall L., Adams G. P. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. 72. 2009. 81-90.

John A., Wolliams D. P., Scherf B. Surveying animal genetic resources to manage biodiversity. *Recursos genéticos animales*. FAO. 2010. 47. 23-30.

Kanitz W., Becker F., Schneider F., Kanitz E., Leiding C., Nohner H. P., Pôhland R. Superovulation in cattle: Practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev.* 42. 2002. 587-599.

Kline JT, Kline D. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: evidence from inositol trisphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. *Biology of Reproduction*. 50. 1994. 193–203.

Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 59. 1998. 103–114.

Kungonza D. R., Nabasirye M., Mpairwe D., Hanotte O., Okeyo A. M., Productivity and morphology of Ankole cattle in three livestock production systems in Uganda. *Recursos Genéticos Animales*. FAO. 48. 2011. P 13-22.

Lago R., Gómez R., Lago F., Gómez R. J., Gualillo O. Leptin beyond body weight regulation-Current concepts concerning its role in immune function and inflammation. *Cellular Immunology*. 252. 2008. 139-145.

Larson J. E., Lamb J. S., Stevenson J. S., Johnson S. K., Day M. L., Geary T. W., Kesler D. J., DeJarnett J. M., Schinck F. N., DiCostanzo A., Arseneau. Synchronization of estrus in suckled beef cows for detected estrus and artificial insemination and timed artificial insemination using GnRH, PGF2 α and progesterone. *J. Anim. Sci.* 84. 2004. 332-342.

Larson J. E., Thielen K. N., Funnell J. S., Stevenson J. S., Kesler D. J., Lamb G. C. Influence of a controlled internal drug release after fixed-time artificial insemination on pregnancy rates and returns to estrus of nonpregnat cows. *J. Animal Sci.* 87. 2009. 914-921.

Lentner M. Experimental Design and analysis. Second Edition. Virginia Polytechnic Institute and State University. 1993. P 63-64.

Lerner, S., Thayne, W., Baker, R., Hensche, T., Meredith, S., Inskeep, E., Daailey, R., Lewis, P. Butcher, R. Age, dose FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. J. Anim. Sci. 63. 1986. 176-183.

Leroy J. L. M. R., Opsomer G., De Vliegher S., Vanholder T., Goossens L., Geldhof A., Bols P. E. J., Kruif A., Van Soom A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. Theriogenology. 64. 2005. 2022-2036.

Leroy J. L., Vanholder T., Delanghe J. R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P. E. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Theriogenology. 62. 2004. 1131-1143.

Linares T., Larsson K., Edqvist E. Plasma Progesterone Levels from Oestrus Through Day 7 After A.I. in Heifers Carrying Embryos With Normal Or Deviating Morphology. Theriogenology. 17. 1982. 125-132.

Lindsell CE, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. Theriogenology 26. 1986. 209-219.

Loos F., Bevers M. M., Dieleman S. J., Kruip A. M. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. Theriogenology. 35. 1991. 537-546.

Lopes de Costa L., Chagas e Silva J., Robalo Silva J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. Theriogenology. 56. 2001. 65-77.

Lovie M, García A, Hackett A and Mapletoft RJ. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Follitropin in Holstein cows. Theriogenology 41. 1994. 241.

Lucy M. C. The bovine dominant ovarian follicle. Journal of Animal Science 85. 2007. 89-99.

Macmillan KL and Thatcher WW. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. Biol Reprod 45. 1991. 883-889.

Mapletoft R. J., History and perspectives on bovine embryo transfer. Anim. Repro. V. 10. n3. 168-173. 2013.

Mapletoft R. J. Bovine embryo transfer. International Veterinary Information Service (IVIS). Reviews in Veterinary Medicine. 2006. (www.ivis.org)

Mapletoft R. J, Bennett-Steward K and Adams GP. Recent advances in the superovulation of cattle. *Reprod Nut Dev* 42. 2002. 601-611.

Martin L. C., Brinks J. S., Bourdont R. M., Cundiff L. V. Genetic effects on heifer puberty and subsequent reproduction. *J. Anim. Sci.* 1992. 70: 4006-4017.

Martínez J. R., Gallego G., Onofre J., Pérez., Vasquez R. Evaluación de la variabilidad y potencial genético de poblaciones de bovinos criollos colombianos. *Boletín de información sobre recursos genéticos animales. FAO.* 44. 2009. 67- 76.

Martinez MF, Adams GP, Bergfelt D, Kastelic JP and Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci* 57. 1999. 23-33.

Martínez V. G^b., Montañó B. M., Palacios F. J. A. Efectos genéticos directos, maternos y heterosis individual para tasas de estro, gestación, parición y destete de vacas Criollo, Guzerat y sus cruzas F1. *Técnica Pecuaria.* 44 (2). 2006. 143-154.

Martínez V. G. 2005 El ganado bovino Criollo en Nayarit: Ubicación y población estimada. Sitio Experimental el Verdineño. INIFAP-CIRPAC. Folleto Técnico N°1. Noviembre. Nayarit, México.

Martínez V. G., Bustamante G. J. J., Palacios F. J. A., Montañó B. M. 2006. Efectos raciales y heterosis materna Criollo-Guzerat para crecimiento posdestete y características de la canal. *Técnica Pecuaria*, 2006, 44 (1), 107-118.

Martínez V. G., Montañó B. M., Palacios F. J. A. 2008. Productividad hasta el destete de vacas Criollo, Guzerat y sus cruzas recíprocas F1. *Técnica Pecuaria* 2008, 46(1), 1-12.

Mateos R. A., Hernández C. J., Morales R. J. S., Rodríguez T. G. Tamaño folicular, progesterona y estradiol plasmáticos en los días 12-14 posinseminación y porcentaje de concepción de vacas Holstein. *Arch. Zootec.* 51 : 327- 334. 2002.

Matos, C. A. P., D. L. Thomas, D. Gianola, M. Perez-Enciso, and L. D. Young. 1997. Genetic analysis of discrete reproductive traits in sheep using linear and nonlinear models: II. Goodness of fit and predictive ability. *J. Anim. Sci.* 75:88-94.

Matthiesen M. M., Effect of donor age on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes obtained by repeated OPU from nonstimulated and FSH-superstimulated German Simmental heifers and cows at different life cycle stages. 2011. Tesis Doctoral de la Universidad de Múnchen.

Mattoni Mukasa-Mugerwa Cecchini G., Sovani S. The reproductive performance of east african (*Bos Indicus*) zebu cattle in ethiopia. 1. Estrous cycle length, duration, behavior and ovulation time. *Theriogenology*. 30.1988. 961-971.

Medina G. G., Ruiz C. J. A., Martínez P. R. A. Los Climas de México. Una estratificación ambiental basada en el componente climático. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Libro Técnico N°. 1. Marzo de 1998.

Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 2004 83: 13–20.

Motta D. P. A., Ramos C. N., González S. C. M., Castro R. E. C. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *Veterinaria y Zootecnia* 5(2) 2011. 88-99.

Nasser L, Adams GP, Bó GA and Mapletoft RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40 1993. 713-724.

Nilchuen P., Chomchai S., Rattanatabtimtong S. Superovulation with different doses of follicle stimulating hormone in Kamphaeng Sean beef cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11 (5). 2012. 676-680.

Olesen, I., M. Perez-Enciso, D. Gianola, and D. L. Thomas. 1994. A comparison of normal and nonnormal mixed models for number of lambs born in Norwegian sheep. *J. Anim. Sci.* 72:1166–1173.

Ossa G., Abuabara Y., Pérez G. J. E., Martínez G. El ganado criollo colombiano Costeño con cuernos (CCC). *Recursos Genéticos Animales*. FAO. 48. 2011. P 101-107.

Oyewole A., Everett H. Plasma Progesterone Concentration In *Bos Taurus* and *Bos Indicus* heifers. *Theriogenology*. 6. 1980. 411-420.

Pavani K., Carvalhais I., Faheem M., Chaveiro A., Vieira R. F., Moreira da S. F. Reproductive performance of Holstein Dairy Cows Grazing in Dry-summer Subtropical Climatic Conditions: Effect of Heat Strees and Heat Shock on Meiotic

Competence and *In Vitro* Fertilization. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* Vol 28, N°3: 334-342. 2015.

Pilling D. Threats to animal genetic resources for food and agriculture—approaches to recording, description, classification and analysis. *Recursos genéticos animales*. FAO. 2010. 47. 11-22.

Ptaszynska M. 2008. Compendium de reproducción animal. 9°na edición. *Reproducción Bovina*. Pag. 15-20.

Pursley JR, Mee MO and Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 and GnRH. *Theriogenology* 44. 1995. 915-23.

Putney D. J., Drost M., Thatcher W. W., Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*. 27. 1989. 765-778.

Quaresma M. A., Lopes de Costa L., Robalo Silva J. Superovulation of Mertolenga cows with two FSH preparations (FSH-P and FOLLTROPIN). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias*. 98. 2003. 81-84.

Quezada C. A., Avedaño R. L., Ramírez G. J. A., Macías C. U., Correa C. A. 2014. Behavioural, follicular and hormonal characteristics of the oestrous cycle of Mexican Criollo cattle. *Animal Production Science*, 2014, 54, 277-284.

Rahman M. R., Rahman M. M., Wan Khadijah W. E., Abdullah R. B. Follicle stimulating hormone (FSH) dosage based on body weight enhances ovulatory responses and subsequent embryo production in goats. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* Vol 27, N°9. 2014. 1270-1275.

Rhoads M. L. , Kim J. W. , Collier R. J. , Croke B. A., Boisclair Y. R. , Baumgard L. H. , Rhoads R. P. Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. *J. Dairy Sci.* 93 2010.170–179.

Rodríguez C.A, Ayres H, Reis E.L. Artificial insemination and embryo transfer pregnancy rates in high production Holstein breedings under tropical conditions. *Proceeding 15th Congress on Animal Reproduction*. 2. 2004. 396.

Rosales M. F. Superovulación en ganado lechero Criollo tropical. Tesis presentada para obtener el grado de maestro en ciencias. Colegio de Postgraduados. Postgrado de recursos genéticos y productividad ganadería. 2013. Montecillo, Texcoco, Edo de México. México.

SAGARPA Programa Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios, <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Paginas/default.aspx>

Saldarriaga J. P., Cooper D. A., Cartmill J. A., Zuluaga J. F., Stanki R. L., Williams G. L. Ovarian, hormonal and reproductive events associated with synchronization of ovulation and timed appointment breeding of *Bos Indicus* influenced cattle using intravaginal progesterone, gonadotropin-releasing hormone, and prostaglandin F_{2α}. *J. Anim. Sci.* 85. 2007. 151-162.

Sánchez A. C., Ramírez G. J. A., Domínguez D. D., Corral F. G., Grado A. J. A., Mariñel A. A. F., Santellano E. E. Respuesta de vacas Criollas de rodeo a la suplementación con selenio y propionato de calcio, y a la sincronización de la ovulación. *TECNOCENCIA Chihuahua*. Vol VII, N°3. 2013. 132-138.

Sangsritavong S., Combs D. K., Sartori R., Armentano L. E., Wiltbank M. C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17β in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85. 2002. 2831-2842.

Sartori R., Barros C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproductions Science*. 124. 2011. 244-250.

Sartori R., Huaghian J. M., Shaver R. D., Rosa GJM., Wiltbank M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 87. 2004. 19-24.

Scaramuzzi R. J., Baird D. T., Campbell B. K., Driancourt M. A., Dupont J., Fortune J. E., Gilchrist R. B., Martin G. B., McNatty K. P., McNeilly A. S., Monget P., Monniaux D., Viñoles C., Webb R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 23. 2011. 1-24.

Scherf B., Tixier B. M. Production environment recording. *Boletín de información sobre recursos genéticos animales*. FAO. 2009. 44. 7-10.

Seidel G. E. Jr., Elsdén P. R., Hasler. J. F. Embryo transfer in dairy cattle. Third Edition. *Hoards Dairyman*. 2003.

Silva J. R. V., Figueiredo J. R., Van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 71. 2009. 1193-1208.

Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 55. 2001. 1241–1254.

Sistema estatal de monitoreo Agroclimático de Nayarit.
<http://www.climanayarit.gob.mx/>

Soares F. M. C., Soares J. R., Lage C. G., Jacomini A. L., Silva C. V., Gómez C. M., Oliveira C. M. F. Conservación del bovino Curraleiro: cuantificación del censo y caracterización de los criadores. Recursos Genéticos Animales. FAO. 48. 2011. P 109-116.

Son D. G., Choe C. Y., Cho S. R., Choi S. H., Kim H. J., Kim H. The effect of reduced dose and number of treatments of FSH on superovulatory response in CIDR-Treated Korean Native cows. Journal of Reproduction and Development. Vol 53. N°6. 2007. 1299-1303.

Staigmiller R. B., Bellows R. A., Anderson G. B., Seidel G. E., Foote W. D., Menio A. R., Wright R. W. Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. Theriogenology. 37. 1992. 1091-1099.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonç,alves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. Biol Reprod 2001 64. 904–909.

St-Pierre N. R., Cobanov B., Schmitkey G. Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries . J. Dairy Sci. 86:(E. Suppl.):E52–E77 © American Dairy Science Association, 2003.

Stroud B., Hasler J. F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. Theriogenology. 65. 2006. 65-76.

Su L, Yang S, He X, Li X, Ma J, Wang Y, Presicce GA, Ji W. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. Reproduction of Domestic Animals. 2012. 47 (2) 184-189.

Sugano M., Watanabe S. Use of Highly purified porcine FSH preparation for superovulation in Japanese Black cattle. J. Vet. Med. Sci. 59. 1997. 223-225.

Sumretprasong J., Leangcharuen N., Thuangsanthia A., Thijae K. Dose response to superovulation in Thai Dairy Cattle. Proceedings The 15th of FAVA. FAVA-OIE Joint Symposium on Emerging Diseases. 2008. Bangkok, Thailand.

Thomas G. D. Relationship of nutrition to successful embryo transplantation. Theriogenology. 13. 1980. 27-39.

Tríbulo Andrés, Rogan Dragan, Tribulo Humberto, Tribulo Ricardo, Alasino Roxana V, Beltramo Dante, Bianco Ismael, Mapletoft Reuben J and Bó, Gabriel A. Superstimulation in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci* 129. 2011. 7-13.

Tríbulo Andrés, Rogan Dragan, Tribulo Humberto, Tribulo Ricardo, Mapletoft Reuben J and Bó Gabriel A. Superovulation of beef cattle with a split intramuscular administration of Folltropin-V in two different concentrations of a slow release formulation. *Theriogenology* 77. 2012. 1679-1685.

Tubman L. M., Brink Z., Suh T. K., Seidel, Jr G. E. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J Anim Sci* 2004. 82:1029-1036.

van der Lende T. Physiological aspects of reproduction and fertility in dairy cows. *Journal Interbull.org. InterBull, Bulletin.* 1998. 33-39.

Vasconcelos J. L. M., Sangsritavong S., Tsai S. J., Wiltbank M. C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology.* 60. 2003. 795-807.

W.L., Nebel R.L., McGilliard M.L. Time of Ovulation Relative to Mounting Activity in Dairy Cattle. 79. 1996. 1555-1561.

Webb R., Garnsworthy P.C., J.G. Gong J. G., Armstrong D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J. Animal. Sci.* 2004. 82. 63–74.

Weller, J. I., I. Misztal, and D. Gianola. 1988. Genetic analysis of dystocia and calf mortality in Israeli-Holsteins by threshold and linear models. *J. Dairy Sci.* 71:2491–2501.

Willet E. L., Black W. G., Casida L. E., Stoen W. H., Buckner P. J., Successful transplantation of a fertilized ovum. *Science.* 1951. 113-247.

Wiltbank M. C., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S., Gumen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology.* 65. 2006. 17-29.

Wu GM, Sun QY, Mao J, Lai L, McCauley TC, Park KW, Prather RS, Didion BA, Day BN. 2002. High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor Kinase inhibitor, Butyrolactone I. *Biology of Reproduction.* 67:170-177.

Yamamoto T., Iwata H., Goto H., Shiratukis S., Tanaka H., Monji Y., Kuwayama T. Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes. *Molecular Reproduction Development*. 77. 2010 (7). 595-604.

Yang X., Kubota C. Suzuki H., Taneja M., Bols P. E. J., Presicce G. A. Control of oocyte maturation in cows. *Biological Factors. Theriogenology*. 49. 1998. 471-482.

Yousif I. A., Fadl El-Moula A. A. Characterisation of Kenana cattle breed and its production environment. *Boletín de información sobre recursos genéticos animales. FAO*. 38. 2006. P 47-56.

Zárate M. J. P. Alternativas de manejo y uso de CIDR, Progesterona, β -Estradiol y PGF2 α para la Sincronización del Estro en vacas Criollas de Rodeo. Disertación presentada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia. Secretaria de Investigación y Posgrado. Chihuahua, Chihuahua., México. Enero 2008.

Zárate M. P. J., Ramírez G. J. A., Rodríguez A. F. A. Comportamiento reproductivo de vacas Criollas con amamantamiento restringido y sincronización del estro. *Agronomía Mesoamericana*. 21 (1), 2010. 121-130.