

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

SUPEROVULACIÓN EN GANADO CRIOLLO LECHERO TROPICAL

FROYLAN ROSALES MARTÍNEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO


2013

La presente tesis titulada “**SUPEROVULACIÓN EN GANADO CRIOLLO LECHERO TROPICAL**”, realizada por el alumno **FROYLAN ROSALES MARTÍNEZ**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido revisada y aprobada por el mismo, y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ

DIRECTOR DE
TESIS



DR. ADALBERTO ROSENDO PONCE

ASESOR



DR. RODOLFO CANSECO SEDANO

ASESOR



DR. CÉSAR CORTÉZ ROMERO

ASESOR



DR. GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, estado de México, 28 de febrero de 2013.

SUPEROVULACIÓN EN GANADO CRIOLLO LECHERO TROPICAL

Froylan Rosales Martínez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN

Se desconoce la respuesta superovulatoria de la hembra Criollo Lechero Tropical (CLT) a la administración de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y se requiere superovular hembras genéticamente superiores. El objetivo del presente estudio fue establecer el mejor protocolo de ovulación múltiple en hembras CLT utilizando FSH. Se realizaron dos ensayos en dos unidades ganaderas de la Región Central del estado de Veracruz de clima cálido subhúmedo. En el primer ensayo se utilizaron 12 vaquillas (35.0 ± 1.7 meses y 404.9 ± 11.6 kg) y en el segundo 6 vaquillas y 5 vacas (50.6 ± 6.2 meses y 429.6 ± 12.1 kg). Las hembras pastorearon pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*), grama nativa (*Paspalum ssp*) y pasto pará (*Brachiaria mutica*) con un suplemento comercial con 18% de proteína, $2 \text{ kg d}^{-1} \text{ animal}^{-1}$ y $15 \text{ kg d}^{-1} \text{ animal}^{-1}$ de ensilado de maíz. En el primer ensayo se utilizaron tres niveles de FSH de 260, 210 y 160 mg de Folltropin-V por hembra y en el segundo solamente 260 y 210 mg. Las variables de respuesta se analizaron con un modelo lineal de efectos fijos. Los datos fueron procesados con el procedimiento de modelos generalizados (GENMOD) del SAS con una distribución de *Poisson*. El peso y la edad influyeron en el número de cuerpos lúteos y se encontraron diferencias entre tratamientos ($p \leq 0.0001$). La edad, el peso y la condición corporal influyeron en el total de estructuras recolectadas (TER) y ovocitos no fertilizados (ONF). Solamente en TER y ONF se encontró diferencia estadística ($p \leq 0.0003$ y $p \leq 0.01$) entre tratamientos, pero no en embriones degenerados, blastocisto, embriones calidad 1 y embriones transferibles ($p > 0.05$). Las dosis de 260 y 210 mg de FSH indujeron similar número de embriones transferibles (3.2 ± 0.7 y 3.0 ± 0.8) y de calidad 1 (2.8 ± 0.8 y 2.8 ± 0.7), por lo que la dosis de 210 mg de FSH sería la más adecuada para la superovulación de hembras CLT.

Palabras clave: Embriones, bovino criollo, FSH, Veracruz.

SUPEROVULATION IN TROPICAL MILKING CRIOLLO CATTLE

Froylan Rosales Martínez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

ABSTRAC

The superovulatory response of the Tropical Milking Criollo (CLT) female to the administration of follicle stimulating hormone (FSH) is unknown and it is required to super ovulate genetically superior females. The aim of this study was to establish the best protocol to multiple ovulation in CLT females using FSH. Two trials were conducted in two livestock units of the Central Region of the state of Veracruz which has a warm subhumid climate. In the first trial, 12 heifers (35.0 ± 1.7 months and 404.9 ± 11.6 kg) were used and in the second six heifers and five cows (50.6 ± 6.2 months and 429.6 ± 12.1 kg). The Criollo females grazed star grass (*Cynodon plectostachyus*), native grass (*Paspalum ssp*) and pará (*Brachiaria mutica*) and were supplemented with a commercial feed with 18% protein, 2 kg d^{-1} animal⁻¹ and 15 kg d^{-1} animal⁻¹ corn silage. In the first trial three FSH levels of 260, 210 and 160 mg Folltropin-V were used per female and in the second one only 260 and 210 mg. The response variables were analyzed with a fixed effect linear model. The data were processed using the generalized model procedure (GENMOD) of SAS with a Poisson distribution. The weight and age influenced the number of corpora lutea and differences were found between treatments ($p \leq 0.0001$). The age, weight and body condition influenced the total collected structures (TER) and unfertilized oocytes (ONF). Difference between treatments were only found ($p \leq 0.0003$ and $p \leq 0.01$) in TER and ONF, but not in degenerate embryos, blastocyst, embryos quality 1 and transferable embryos ($p > 0.05$). Doses of 260 and 210 mg of FSH induced similar number of transferable embryos (3.2 ± 0.7 and 3.0 ± 0.8) and of quality 1 (2.8 ± 0.8 and 2.8 ± 0.7), so that the dose of 210 mg of FSH would be more suitable for CLT female superovulation.

Keywords: Embryos, criollo cattle, FSH, Veracruz.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme lograr una meta más en mi vida, por levantarme en los momentos difíciles y no abandonarme nunca.

Al Colegio de Postgraduados por el financiamiento de este proyecto a través del Fideicomiso revocable de administración No. 167304, para financiamiento a proyectos de investigación de tesis 2011, al campus Montecillo, por abrirme las puertas y permitirme realizar mis estudios de maestría y al campus Veracruz por el apoyo con la suplementación de los animales experimentales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la manutención durante el transcurso de los estudios de maestría.

A mi Profesor Consejero, el Dr. Carlos Miguel Becerril Pérez, por su amistad y por la dedicación y sugerencias durante todo el estudio de maestría, así como en las revisiones de la tesis, lo cual ha influido directamente durante mis estudios de posgrado.

A mi Director de Tesis, el Dr. Adalberto Rosendo Ponce por la amistad brindada durante todo este tiempo, por abrirme las puertas al proyecto de ganado Criollo Lechero Tropical y por todas sus enseñanzas durante todos estos años.

Al Dr. César Cortez Romero, por su apoyo incondicional durante la realización de mis estudios de maestría y por sus acertadas sugerencias durante la redacción de la tesis y el artículo.

Al Dr. Rodolfo Canseco Sedano, por su invaluable participación durante la fase de campo de este proyecto, por sus sugerencias para entender el desarrollo de la técnica utilizada en el proceso de superovulación y colecta de embriones.

Al Dr. Glafiro Torres Hernández por su importante participación en mi formación académica, por su apoyo y sugerencias durante todo el tiempo de mis estudios de posgrado y sus acertadas correcciones en la redacción del escrito.

A mis compañeros y amigos, Roberto, Amado, Ángel, Moy, Chacón, don Andrés, Pocholo y Panchito, que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme durante toda la fase experimental.

Dedico esta tesis a:

Dios

Porque sin el nada es posible.

A mi esposa Citlallis

Por el inmenso amor que me ha brindado durante todo este tiempo, por su paciencia en todos los momentos de ausencia y por su apoyo incondicional durante todo el tiempo transcurrido en mis estudios de maestría.

A mis padres Luisa Martínez Cruz y Aquilino Rosales Allende

A ellos que siempre me inculcaron valores los cuales me han abierto muchas puertas y han hecho de mi un hombre de bien, me han enseñado que no existe nada imposible siempre y cuando se tenga la voluntad de hacer las cosas.

A mis hermanos, Maribel, Verónica, Columba y Rolando

Porque con ellos he vivido los mejores momentos de mi vida al lado de nuestros padres y día a día me demuestran su cariño y apoyo incondicional lo cual me permite lograr todas las metas planteadas.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Historia de la transferencia de embriones en bovinos	4
2.2. Fisiología de la reproducción bovina	5
2.2.1. Maduración de los folículos ováricos y de los ovocitos	5
2.2.2. Comportamiento reproductivo en la hembra bovina	6
2.2.3. El ciclo estral en la hembra bovina	7
2.3. Selección y manejo de donadoras de embriones	8
2.4. Hormonas utilizadas para inducir ovulación múltiple	9
2.4.1. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)	9
2.4.2. Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG)	10
2.4.3. Extractos de pituitaria	10
2.5. Protocolos utilizados para inducir ovulación múltiple	11
2.5.1. Protocolo tradicional	11
2.5.2. Protocolos a tiempo fijo	12
2.5.2.1. Protocolo con progestágenos y estradiol	12
2.5.2.2. Protocolo que utiliza un agonista de GnRH	13
2.5.2.3. Protocolo que utiliza la ablación del folículo dominante (FD)	14
2.6. Factores que afectan los programas de ovulación múltiple	14
2.6.1. Factores asociados a la raza	14
2.6.2. Factores nutricionales	15
2.6.3. Factores asociados a la edad	16
2.6.4. Factores hormonales	16
2.6.5. Factores ambientales	17

2.7. Justificación.....	18
2.8. Objetivos	19
2.8.1. Objetivo general	19
2.8.2. Objetivos específicos	19
2.9. Hipótesis	19
2.9.1. Hipótesis general.....	19
2.9.2. Hipótesis específicas.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Localización del área de estudio	20
3.2. Animales experimentales	20
3.3. Manejo de las donadoras de embriones	21
3.4. Protocolo de superovulación y tratamientos.....	21
3.5. Recolección y clasificación de embriones	22
3.6. Variables de respuesta.....	23
3.6.1. Cuerpos lúteos (CL)..	23
3.6.2. Ovocitos no fertilizados (ONF)..	23
3.6.3. Embriones degenerados (ED)..	23
3.6.4. Blastocistos (B).	23
3.6.5. Embriones calidad 1 (EC1).....	24
3.6.6. Embriones transferibles (ET).....	24
3.6.7. Total de estructuras colectadas (TEC).	24
3.7. Análisis estadístico	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Cuerpos lúteos	26
4.2. Ovocitos no fertilizados	27

4.3. Embriones degenerados	27
4.4. Blastocisto	27
4.5. Embriones calidad 1	28
4.6. Embriones transferibles.....	28
4.7. Total de estructuras recolectadas	28
5. CONCLUSIONES	30
6. LITERATURA CITADA.....	31
7. ANEXOS	44

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Respuesta superovulatoria a dos diferentes dosis de FSH (Folltropin-V) en donadoras Criollo Lechero Tropical.	26
Figura 1. Protocolo de superovulación utilizado en ganado Criollo Lechero Tropical	22

1. INTRODUCCIÓN

La región tropical cálida de México, se caracteriza por presentar temperaturas elevadas, humedades relativas altas, variadas velocidades del viento y una gran diversidad de endo y ectoparásitos del ganado, que influyen en su productividad (Arias *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2009). La introducción de razas *Bos Índicus* y *Bos taurus* de climas templados, han remplazado a las ganaderías con genotipos locales adaptados (Segura-Correa y Montes-Pérez, 2001).

Hoy en día ha aumentado la necesidad de multiplicar animales genéticamente superiores, adaptados a las condiciones adversas que se presentan en los trópicos (Baruselli *et al.*, 2006). Estos animales representan un recurso alternativo para mantener la producción animal bajo cualquier cambio drástico de tipo ambiental o económico (Segura-Correa y Montes-Pérez, 2001). En 1981, la FAO hizo una recomendación a los países Latinoamericanos de conservar y evaluar el germoplasma de animales domésticos nativos y adaptados.

En México, gracias a los esfuerzos de científicos interesados en la conservación de razas de ganado criollo, se cuenta desde la época de los años 60 con una raza criolla enfocada hacia la producción de leche. Esta raza de nombre Criollo Lechero Tropical (CLT) desciende del ganado español traído a América durante la conquista y colonización española, este ganado manifiesta su adaptación a los climas tropicales adquirido a lo largo de más de 500 años de selección natural, el cual se refleja en sus buenos índices productivos y reproductivos (Rouse, 1977; de Alba, 2011).

En la actualidad, existen biotecnologías reproductivas modernas (Moore y Thatcher, 2006; Andrabi y Maxwell, 2007; Velázquez, 2008) las cuales han sido utilizadas para la conservación, expansión y mejora genética de las poblaciones bovinas adaptadas a los climas tropicales.

Una de ellas es la Ovulación múltiple y Transferencia de embriones (OMTE), mediante estas biotecnologías se logra acortar el intervalo generacional y se explota al máximo el potencial genético de vacas y sementales genéticamente superiores (Lohuis, 1995) aprovechando la gran reserva de ovocitos disponibles en los ovarios de las vacas.

Mediante la implementación de esta biotecnología, se ha facilitado el transporte de material genético entre países debido a los bajos costos para transportar embriones en comparación con animales vivos (Mapletoft y Hasler, 2005). Además se ha comprobado que el manejo adecuado para la obtención de embriones siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS International Embryo Transfer Society por sus siglas en inglés) disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades (Thibier y Stringfellow, 2003; Givens y Marley, 2008; Thibier, 2010).

Desde los inicios de esta biotecnología se han realizado numerosas investigaciones con el propósito de mejorar la calidad y el número de embriones; sin embargo el número de estos sigue siendo en promedio de 5 por donadora con calidad transferible (Bó *et al.*, 2006) y a través de diversos protocolos de ovulación múltiple se ha logrado establecer el momento óptimo para realizar la inseminación de las donadoras. De igual forma se ha investigado la eficiencia de diversos productos hormonales con los cuales se han identificado algunos factores asociados a la administración exógena de gonadotropinas que afectan la respuesta superovulatoria (Mapletoft *et al.*, 2002).

En la actualidad se han establecido protocolos de OMTE a tiempo fijo, con lo cual se pueden programar los tiempos para la aplicación de estas biotecnologías. Los avances en las técnicas de criopreservación de embriones (Arav *et al.*, 2002; Mapletoft, 2012) han facilitado la importación y exportación, así como la creación de bancos de germoplasma con material genético disponible de animales élite.

Actualmente el uso de la OMTE como biotecnologías reproductivas para mejoramiento genético ha tomado mucha importancia, los avances en la investigación de estas técnicas permiten un mejor manejo de donadoras (Baruselli *et al.*, 2011), con lo cual alrededor del mundo más de 500,000 embriones son producidos anualmente de donadoras superovuladas (Mapletoft, 2012). En el año 2009 se transfirieron a nivel mundial 539,683 embriones bovinos producidos *in vivo*.

México es un país con actividad vigente en las técnicas de OMTE, en el año 2009, de este país se reportaron 1,875 lavados y un total de 10,270 embriones transferibles colectados. En este reporte se mencionó que se transfirieron 9,000

embriones bovinos durante este año, mayormente de razas especializadas en producción de carne, incluyendo embriones producidos *in vitro* e *in vivo* (Stroud y Chairperson, 2010).

Se prevé que en el futuro, las técnicas de OMTE crecerán en grandes proporciones, minimizaran los costos de los fármacos utilizados y las técnicas podrán ser aplicadas no solo por profesionales en veterinaria, mejorarán los esquemas de superovulación y transferencia (OMTE o MOET Multiovation and Embryo Transfer, por sus siglas en inglés) y se intensificará el uso de hembras y sementales con alto merito genético (Christensen, 1991; Hasler, 2003).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Historia de la transferencia de embriones en bovinos

El primer reporte de transferencia de embriones (TE) fue realizado por Heape (1890), quien logró la primera transferencia exitosa de la historia. El demostró que embriones de conejo de determinada raza, podían ser gestados en el tracto reproductivo de hembras de otra raza. En los años treinta del siglo pasado se experimentó en ratas, cabras y ovejas (Betteridge, 1981). Las primeras investigaciones se realizaron en pequeñas especies; sin embargo Umbaugh (1949) reportó cuatro preñeces en Texas (USA), resultado de la TE en bovinos, pero estos resultados fueron negativos debido a que todas las receptoras abortaron. En el año 1951, se reportó la transferencia con éxito de un embrión bovino, el cual culminó con el nacimiento de un ternero, la donante era una vaquilla un cuarto Shorthorn y tres cuartos Holstein, el padre era un toro Holstein puro, el becerro presentó los colores característicos de los padres, además se le analizó el tipo de sangre, con lo cual se comprobó que se desarrolló a partir del embrión transferido (Willett *et al.*, 1951).

La transferencia comercial de embriones se desarrolló en Norteamérica en la década de los setenta. Esto se vio favorecido por dos eventos separados, el primero fue la publicación de los excelentes resultados de los métodos no quirúrgicos para la colecta y TE, el segundo fue la decisión del gobierno canadiense para la importación de las razas continentales (Betteridge, 1981; Betteridge, 2003).

Con la introducción de las razas europeas a Norteamérica se obtuvieron excelentes resultados en el ámbito económico, la demanda de una rápida propagación de individuos de estas nuevas razas estimuló los esfuerzos para maximizar el número de hembras y acortar el intervalo generacional. Esta secuencia de eventos expuso técnicas y habilidades con posibilidades comerciales y surgió el interés de una sociedad de científicos profesionales, la cual fue fundada en el año de 1974 con el nombre de Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS; Carmichael y D.V.M, 1980). En 1978, la sociedad estaba representada por 120 personas, representantes de 11 países (Schultz y D.V.M, 1980). Actualmente existen sociedades de transferencia embrionaria en diferentes países como son: la (AATE o AETA,

American Embryo Transfer Association), la (AETE o EETA, European Embryo Transfer Association), la (ACTE o CETA, Canadian Embryo Transfer Association), y la (SBTE o SBET, Society of Brazilian Embryo Technology), teniendo establecidos una colección de protocolos y reportando año con año en forma consistente las actividades realizadas (Stroud y Chairperson, 2010).

En la actualidad la TE en bovinos ha evolucionado de manera considerable, en el año 2009, a nivel mundial fueron transferidos 841,540 embriones producidos *in vitro* e *in vivo*, encontrándose la actividad de transferencia embrionaria en países de los 5 continentes (Stroud y Chairperson, 2010).

2.2. Fisiología de la reproducción bovina

2.2.1. Maduración de los folículos ováricos y de los ovocitos

En los bovinos como en la mayoría de los animales domésticos, el curso de la ovogénesis que inicia durante la vida fetal, está constituido por un depósito de aproximadamente 150 000 folículos primordiales al nacimiento, sin llegar a ser nulos jamás aún en vacas de 15 a 20 años (Erickson, 1966).

Los folículos primordiales, que constituyen la reserva a partir de la cual se efectuará la foliculogénesis, están constituidos de un ovocito de tamaño pequeño (30-35µm de diámetro) rodeado de un número variable (7 a 50) células de la granulosa. El aumento en el tamaño del folículo durante su crecimiento se divide en dos fases. Una fase preantral (de 50 a 200 µm de diámetro) en la cual el folículo es una estructura completa; por otra parte, una fase antral (200 µm de diámetro hasta la ovulación), donde el folículo se hace de una cavidad, el antro, que contiene volúmenes crecientes de líquido folicular (Driancourt, 1999).

Una vez que los folículos primordiales inician su desarrollo en la etapa posnatal, tendrán dos posibles destinos, si el medio hormonal es el apropiado continuarán su desarrollo y eventualmente liberaran un ovulo maduro durante la ovulación. Sin embargo, la mayoría de los folículos (99.9 %) nunca ovulan y se degradan mediante un proceso referido como atresia, apoptosis o muerte celular programada (Meza, 2003).

En un folículo maduro se encuentran tres tipos de células: las células de la teca, las células de la granulosa y el ovocito. Las células de la teca conforman la capa externa del folículo y se dividen en dos tipos celulares: una capa externa fibrosa (teca externa) y una capa interna altamente vascularizada (teca interna). Las células de la granulosa son el mayor constituyente celular del folículo y tienen como función aspectos nutritivos y endocrinos. Al centro del folículo se encuentra el ovocito, en el cual se concentra la información genética de la hembra. En folículos maduros es muy evidente una cavidad rellena de fluido folicular (Erickson y Shimasaki, 2001; Richards *et al.*, 2002).

2.2.2. Comportamiento reproductivo en la hembra bovina

El inicio de la actividad reproductiva en la hembra bovina se presenta durante la pubertad, esta se identifica con la exhibición del primer celo acompañado por el desarrollo de un cuerpo lúteo y mantenido por un tiempo suficiente hasta iniciar un nuevo ciclo (Kinder *et al.*, 1987).

En los bovinos, las vacas muestran una media de entre 12 a 16 horas en las manifestaciones del celo (Gordon, 2003), ocurriendo la ovulación entre 25 y 30 horas después de iniciado el estro, cada uno de estos eventos fisiológicos mantienen una duración variable según la época del año y el genotipo del animal (Domínguez *et al.*, 2004). Se ha detectado que tanto en estros naturales como en los inducidos con protocolos hormonales la presencia en el hato de más de una hembra en celo desencadena una interacción sexual de montas y otras conductas estimulantes del reclutamiento e intervención sexual de otras vacas, con la consiguiente formación transitoria y móvil de grupos homosexuales o heterosexuales conocidos como grupos sexuales activos (Galina *et al.*, 1996; Castellanos *et al.*, 1997; Orihuela, 2000). Sin embargo, en las vaquillas que presentan su primera ovulación, los signos de estro en muchas ocasiones son muy escasos, presentándose una alta incidencia de ovulaciones sin manifestaciones de estro; sin embargo, la ausencia de estas no afecta la actividad ovárica o la duración de los ciclos estrales subsecuentes (Morrow, 1969).

2.2.3. El ciclo estral en la hembra bovina

El ciclo estral consiste en una serie de eventos reproductivos, estos se encuentran controlados por el Sistema Nervioso Central, siendo el hipotálamo el encargado de coordinar dichos eventos (Hafez *et al.*, 2000). El peso, la edad y la composición corporal, provocan cambios en la fisiología reproductiva de los animales jóvenes que inician su actividad de cría, al llegar a la pubertad, el cerebro permite una alta frecuencia de pulsos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), cada pulso de GnRH provoca un pulso de hormona luteinizante (LH) desde la parte anterior de la glándula pituitaria, la cual por encima de cierta frecuencia inducirá crecimiento folicular y ovulación (Graeme y Banchemo, 1999).

El ciclo estral se encuentra regulado por la retroalimentación ejercida entre mensajes endocrinos liberados por los componentes del eje hipotalámico-hipofisiario-ovárico (Buffet y Bouchard, 2001). Estas señales son enviadas para generar el establecimiento de una fase folicular y otra lútea, las cuales en conjunto dan como resultado un ciclo estral promedio de 21 días en la vaca y 20 en vaquillas (Frandsen, 1974; Hafez *et al.*, 2000). La función ovárica es controlada por las hormonas LH y folículo estimulante (FSH), secretadas por la pituitaria (Wuttke *et al.*, 1998). Estos eventos solo se verán interrumpidos por la gestación y en algunos casos si la nutrición es inadecuada o si las condiciones ambientales son estresantes puede presentarse un cese en la ciclicidad (Senger, 2005).

El ciclo estral provee a la hembra de repetidas oportunidades para copular y conseguir la gestación, y se encuentra dividido en dos fases mayores. La fase folicular, que consiste en el periodo de regresión del cuerpo lúteo a la ovulación, siendo generalmente corta, aproximadamente el 20% del ciclo estral. En esta fase se da el crecimiento del folículo dominante produciendo grandes cantidades de estradiol (E₂). La fase lútea, que consiste en el periodo de la ovulación hasta la regresión del cuerpo lúteo, durante esta fase la estructura dominante es el cuerpo lúteo y la hormona presente en más grandes cantidades es la progesterona (P₄; Senger, 2005).

La fase folicular y la fase lútea, a la vez se dividen en cuatro subfases. La fase folicular se divide en proestro y estro, y la fase lútea se divide en metaestro y diestro (Senger, 2005).

2.3. Selección y manejo de donadoras de embriones

En un programa de ovulación múltiple, la selección de las donadoras de embriones es un proceso de primordial importancia debido a que el objetivo principal es aumentar el número de terneros genéticamente superiores (Romo, 1993; Bó y Mapletoft, 1999), para ello en el caso de ganado especializado en leche, se debe tomar en cuenta aspectos como la edad de la donadora, esta no debe tener más de 10 años (Hasler *et al.*, 1983), la producción, la duración de la lactancia, la composición de la leche, entre otros, cada uno de acuerdo a los objetivos de la ganadería. Se debe seleccionar donadoras de acuerdo a su superioridad genética disponible en los registros de las asociaciones de cada raza (Stringfellow y Seidel, 1998) y no solo por el tipo o apariencia física de la hembra, debido a que este no indica la superioridad genética en un animal (Seidel y Seidel, 1991).

En cada donadora deberá comprobarse la normalidad del ciclo estral, para ello deben observarse por lo menos 2 ciclos estrales previos al inicio del programa de ovulación múltiple. La donadora debe mostrar el celo y el intervalo promedio, debe estar entre 18 y 24 días (Garzón *et al.*, 2007).

Todas las donadoras deben tener un buen desempeño reproductivo y alta fertilidad (Seidel y Seidel, 1991), sin historia de patologías generales, deberán contar con ovarios funcionales, oviductos sin alteraciones, útero con cuernos de longitud adecuada, y cérvix recto (Stringfellow y Seidel, 1998; Garzón *et al.*, 2007).

El estrés durante el manejo de la donadora es un aspecto importante que se debe considerar (Wildt *et al.*, 1992), debido al estrés se libera cortisol endógeno, el cual suprime la liberación de LH y la ovulación (Matteri y Moberg, 1982). Entre los diferentes tipos de estrés, se encuentra el nutricional, hembras mantenidas en pasturas verdes presentan una alta respuesta superovulatoria en comparación con las mantenidas en pasturas de pobre calidad o incluso alimentadas con ensilado (Stroud y Hasler, 2006).

Kadokawa *et al.* (2008) evaluaron la relación entre la calidad embrionaria y la condición corporal medida en una escala de 1 al 5 en vaquillas Holstein superovuladas y mantenidas en condiciones de campo, encontraron más embriones de grado excelente y bueno en vaquillas con condición corporal de 3.50 en relación a las vaquillas con condición corporal de 2.75, 3.25 o 3.00. En las vaquillas con condición corporal de 2.75 encontraron un mayor número de ovocitos no fertilizados con relación a la condición corporal de 3.25.

El consumo de minerales juega un papel importante en la reproducción, en algunos estudios se reporta que la administración de selenio en combinación con vitamina E incrementan la fertilidad en la hembra bovina (Segerson *et al.*, 1977; Aréchiga *et al.*, 1994). De igual forma el manejo de la donadora puede afectar la respuesta superovulatoria (Stroud y Hasler, 2006), el estrés por transporte, por cambio en la temperatura ambiental, cambios en la dieta y cambios en la rutina de manejo afectan visiblemente la respuesta a los tratamientos de ovulación múltiple (Bényei *et al.*, 2001).

2.4. Hormonas utilizadas para inducir ovulación múltiple

2.4.1. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)

La Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) también llamada Gonadotropina de Suero de Yegua Preñada (PMSG, por sus siglas en inglés), es una glicoproteína secretada en los cálices endometriales del útero de las yeguas, los cuales invaden el endometrio maternal entre los días 36 de la gestación y duran hasta el día 120 (Saltiel *et al.* 1988). La relación FSH/LH de esta hormona varía durante la preñez (Papkoff, 1981).

La eCG tiene un elevado peso molecular y por lo tanto, no logra atravesar el filtro renal, por lo cual tiene una vida media larga en la sangre (Saumande y Chupin, 1986) de aproximadamente 5 (Bevers y Dieleman, 1987) a 10 días (Jiménez, 2009). Debido a esto se puede inducir ovulación múltiple en la hembra bovina mediante la administración de una dosis única entre los días 8 y 14 del ciclo estral (Anderson y Bondurant, 1982; Goulding *et al.*, 1996). Sin embargo, su permanencia prolongada en

la sangre provoca un crecimiento folicular disperso, con niveles altos de estrógenos que afectan la tasa de fertilización y la calidad embrionaria, además de producir anticuerpos mediante la aplicación de tratamientos repetidos (Saumande y Chupin, 1981).

En algunas investigaciones se confirma que este efecto puede contrarrestarse en gran medida con la administración de un suero anti-PMSG suministrado poco después del surgimiento del pico preovulatorio de LH (Saumande *et al.*, 1984; Dieleman y Bevers, 1987). Vos *et al.* (1994) confirman que con la administración de suero anti-PMSG antes o al momento del pico preovulatorio de LH se logra contrarrestar dicho efecto en forma similar.

Hoy en día la PMSG es poco usada para inducir ovulación múltiple, esto se debe a la dificultad para determinar el momento exacto en condiciones prácticas de la aplicación del suero anti- PMSG (Dieleman *et al.*, 1993).

2.4.2. Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG)

La Gonadotropina menopáusica humana (hMG), es un preparado altamente purificado de vida media muy corta y aislado de la orina de mujeres menopáusicas (Lauria *et al.*, 1982). Esta hormona contiene cantidades similares de FSH y LH que permanecen constantes, los tratamientos consisten en dos aplicaciones diarias intramusculares en dosis decrecientes por 5 días (Murphy *et al.*, 1984).

La inducción de la ovulación múltiple con hMG resulta en una eficacia comparable con la administración de FSH-p en vaquillas de carne (McGowan *et al.*, 1985).

De igual forma, al combinar la hMG con la PMSG se obtiene un mayor número de embriones transferibles y se minimiza el número de embriones no fertilizados y degenerados (Bono *et al.*, 1991).

2.4.3. Extractos de pituitaria

Entre los extractos de pituitaria que contienen FSH se encuentran los de origen equino, ovino, bovino y porcino (Bellows *et al.*, 1991; Staigmiller *et al.*, 1992; Singh *et*

al., 1996), los cuales contienen diferente relación FSH/LH, siendo el de origen porcino el más utilizado en el pasado y el presente de la superovulación de hembras bovinas.

La vida media de la FSH en la vaca es de 5 horas (Demoustier *et al.*, 1988). Por lo tanto, se necesitan aplicaciones frecuentes para inducir una adecuada respuesta superovulatoria. El tratamiento de ovulación múltiple con esta hormona se basa en la administración de dos dosis diarias durante 4 ó 5 días (Looney *et al.*, 1981). Tratamientos con dos aplicaciones diarias de FSH han demostrado mayor respuesta superovulatoria que tratamientos con una sola aplicación (Looney *et al.*, 1981; Walsh *et al.*, 1993).

Con el rápido incremento de la transferencia de embriones de manera comercial durante los últimos años, la demanda de FSH de origen porcino se ha incrementado considerablemente, resultando en una limitada disponibilidad del producto en el mercado (Staingmiller *et al.*, 1992).

2.5. Protocolos utilizados para inducir ovulación múltiple

2.5.1. Protocolo tradicional

Experimentos y pruebas de campo realizados durante la década de los ochentas, llevaron a la conclusión general de que los tratamientos de ovulación múltiple iniciados durante los días 8 a 12 después de detectarse el celo, resultan en una mejor respuesta que aquellos iniciados antes (días 2 a 6) o después (día 13 o 14; Donaldson, 1984a; Callesen *et al.*, 1993; Bó y Mapletoft, 1999; Díaz *et al.*, 1999).

El protocolo tradicional de ovulación múltiple, requiere la observación previa del celo de referencia, para iniciar entre los días 8 y 12 del ciclo estral con la administración de dosis continuas o decrecientes de FSH a intervalos de 12 horas (esquema AM y PM; Mapletoft *et al.*, 2002). Al tercer día de iniciadas las aplicaciones de FSH se administra una o dos dosis de PGF2 α con un intervalo de 12 horas y al celo inducido por estas aplicaciones se realizan dos inseminaciones (Rodríguez *et al.*, 1998). La recolección de los embriones se realiza en el día siete después de la inseminación.

La determinación de este protocolo se estableció de manera empírica, al verificarse que los tratamientos iniciados en la mitad del ciclo estral presentaron

mejores resultados que aquellos iniciados en otras fases del ciclo (Lindsell *et al.*, 1986; Goulding *et al.*, 1991). Esto debido a que durante el ciclo estral del bovino se presentan 2 o en ocasiones 3 ondas de desarrollo folicular y en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular inicia en promedio entre los días 9 y 10 (Ginther *et al.*, 1989; Bó y Mapletoft, 1999).

Se han realizado estudios posteriores sobre la fisiología de la dinámica folicular en hembras bovinas, los cuales han permitido sugerir que el inicio del tratamiento con FSH exógena coincide con el surgimiento de la segunda oleada de desarrollo folicular del ciclo estral (Ginther *et al.*, 1996; Ginther, 2000).

2.5.2. Protocolos a tiempo fijo

El esquema tradicional posee algunas dificultades como son; la necesidad de detectar el celo de referencia para la ovulación múltiple y la variabilidad individual en el día de emergencia de la nueva onda de crecimiento folicular (Kulick *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2005). Para sobrellevar estos inconvenientes, se han implementado los métodos basados en el uso de los dispositivos para la liberación de progesterona, subcutáneos o intravaginales, solos o combinados con la aplicación de estrógenos, donde no es necesario un celo de referencia para iniciar. Se argumenta que este esquema promueve la atresia del folículo dominante (FD) presente al momento de iniciar el protocolo y por consiguiente, origina una nueva onda folicular, aproximadamente a los cuatro o cinco días después de insertado el dispositivo (Baruselli *et al.*, 2006).

A través de protocolos que controlan la emergencia de la onda folicular y la ovulación se ha logrado la ovulación múltiple y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) de grupos de donantes, independientemente del momento del ciclo estral en que se encuentren, sin la necesidad de detectar celos (Bo *et al.*, 2011).

2.5.2.1. Protocolo con progestágenos y estradiol

Los protocolos de ovulación múltiple con progestágenos y ésteres de estradiol en el día cero, inducen la atresia de todos los folículos y el inicio de una nueva onda folicular 4 días después de su aplicación (Bó *et al.*, 1996).

Salgado *et al.* (2011) retiraron el dispositivo con progesterona en el momento de la anteúltima aplicación de FSH (Día 7 AM), a este protocolo se le conoce como P24 debido al tiempo transcurrido desde la aplicación de la primera PGF a la remoción del dispositivo. Al protocolo en el cual el dispositivo se retira a las 36 horas de aplicada la PGF se le denomina P36 (Bó *et al.*, 2006).

Después de años de investigación, científicos de la Universidad de Saskatchewan Canadá, desarrollaron un protocolo para sincronizar la onda folicular que permitiera iniciar los tratamientos de ovulación múltiple en el momento más conveniente (Colazo y Mapletoft, 2007).

Para este protocolo, en el día cero, las donantes son tratadas con un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR-B) más una aplicación de Estradiol-17 β (E-17 β) y otra de Progesterona (P₄). En el día cuatro se inicia el tratamiento de ovulación múltiple con FSH por 4 días (AM y PM). En el día seis se inyecta PGF2 α (AM y PM) y se retira el dispositivo con P₄ (PM). Las donantes se inseminan en los días 8 (PM) y 9 (AM: sin detectar celo). La colecta de embriones se realiza en el día 15 y los animales reciben PGF2 α después del lavado (Colazo y Mapletoft, 2007).

2.5.2.2. Protocolo que utiliza un agonista de GnRH

Se han realizado experimentos que programan y sincronizan la ovulación mediante la utilización de agonistas de GnRH (Rajamanhendran *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 2002). El tratamiento con agonistas produce la saturación de los receptores de GnRH y de esta forma las vacas tratadas mantienen inhibida la secreción pulsátil y el pico preovulatorio de LH (Bó *et al.*, 2006), induciendo una prolongada fase folicular (Oussaid *et al.*, 2000). Al aplicar busserelina en el día 8 del ciclo estral causa luteinización o atresia de los folículos grandes existentes en el ovario, y una nueva onda de folículos es reclutada en pocos días (Suárez *et al.*, 2001). Estos mismos resultados fueron obtenidos por Santos *et al.* (2006), al aplicar un implante de deslorelina en vacas lactando.

En un estudio en el cual se comparó el tiempo de aplicación de inyecciones de busserelina 36 y 60 horas después de la aplicación de la PGF2 α , se encontró que el número de embriones aumento al aplicar la busserelina 60 horas más tarde (Voss *et al.*,

1989). Sin embargo Foote *et al.* (1989) obtuvieron un mayor número de estructuras colectadas y embriones de calidad excelente al aplicar la buserelina a las 54 horas después de aplicar la PGF2 α .

2.5.2.3. Protocolo que utiliza la ablación del folículo dominante (FD)

La mayoría de los tratamientos de ovulación múltiple estudiados han sido orientados hacia la eliminación del efecto que produce el FD. Un método mecánico para contrarrestar este efecto es la aspiración de todos los folículos mediante ultrasonografía vaginal (también llamado ablación folicular) el cual resulta en una nueva onda folicular 1.5 días después de realizada la aspiración (Bó y Mapletoft, 1999).

Los resultados de la respuesta superovulatoria en los tratamientos con ablación folicular son similares a los iniciados en los días 8 a 12 del ciclo estral; sin embargo, este protocolo ofrece la oportunidad de iniciar los tratamientos sin la necesidad de detectar estros o la ovulación (Bergfelt *et al.*, 1997).

Lima *et al.* (2007) compararon el momento en que se realiza la ablación folicular entre los días 8 a 12 a la mitad del diestro, antes de iniciar el tratamiento de ovulación múltiple y encontraron que no existe diferencia significativa en el tiempo de ablación folicular a las 0, 24 y 48 horas de removidos los folículos para iniciar la ovulación múltiple, ellos reportaron resultados similares en relación al porcentaje de embriones viables en los tiempos evaluados.

2.6. Factores que afectan los programas de ovulación múltiple

2.6.1. Factores asociados a la raza

Existen diferencias en la respuesta superovulatoria en razas de ganado *Bos taurus* de climas templados en relación a las razas *Bos indicus*, observándose superioridad en el ganado *Bos indicus* en condiciones tropicales (Aké *et al.*, 1995). En algunos estudios se concluyó que los embriones de razas *Bos indicus*, toleran temperaturas más altas que los de razas *Bos taurus* (Kamwanja *et al.*, 1994; Krininger *et al.*, 2003).

Existen importantes diferencias en la fisiología reproductiva de animales *Bos indicus* y *Bos taurus* (Baruselli *et al.*, 2006). En las cuales se ha encontrado que los ovarios de vacas de razas cebuínas necesitan menores dosis de gonadotropinas exógenas para responder a los tratamientos de ovulación múltiple (Munro, 1986; Barros y Nogueira, 2001).

En un estudio efectuado por Donaldson (1984a) en donadoras de 13 razas distintas productoras de carne, se encontró diferencias en cuanto al número de ovocitos y embriones colectados al igual que el número de embriones transferibles en cada raza, siendo las razas *Bos indicus* las que presentaron una mejor respuesta.

Sin embargo en estudios realizados en climas tropicales en vacas criollas de la raza Criollo Limonero (Gonzalez *et al.*, 1997) y Blanco Oreginegro (Rodríguez *et al.*, 1998) se ha obtenido buenos resultados en la respuesta superovulatoria siendo atribuido al grado de adaptabilidad que presentan estas razas a los climas adversos.

2.6.2. Factores nutricionales

El estado nutricional de la donante de embriones puede tener influencia en la ovulación y la fecundación, así como la viabilidad embrionaria. En vacas lactando la ingesta de altas cantidades de proteína en la dieta después del parto causa efectos inconsistentes en la reiniciación de la actividad ovárica, prolongando el intervalo de días para la primera ovulación (Butler, 1998), las altas cantidades de urea en plasma y leche han sido asociadas con una decreciente fertilidad (Elrod y Butler, 1993). En vacas secas, dietas altas en fibra representan una gran oportunidad para mejorar la salud y la fertilidad (Beever, 2006).

Los efectos adversos de una subalimentación en el comportamiento reproductivo del ganado, puede ser debido a la alteración hormonal a nivel del ovario, la glándula pituitaria anterior y el hipotálamo (Schillo, 1992). Por otro lado, dietas demasiado bajas en energía intervienen en aspectos específicos del control neuroendocrino de cada fase de la reproducción, afectando los niveles hormonales necesarios para un correcto funcionamiento (Short y Adams, 1988).

Algunos estudios concluyen que las dietas controladas tienen un efecto positivo en la tasa de ovulación y en la producción de embriones de excelente calidad con

relación a las dietas *ad libitum* en vaquillas de carne (Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999).

2.6.3. Factores asociados a la edad

Se ha comprobado que la edad de la donadora, juega un papel importante en la respuesta superovulatoria, encontrándose un mayor número de embriones en animales menores de 10 años comparado con vacas mayores (Hasler *et al.*, 1981). Estos resultados pueden deberse a una reducción en el número de folículos capaces de responder al tratamiento con gonadotropinas en vacas viejas, debido a que al aumentar la edad existen cambios endocrinos que conyevan a una reducción en la tasa de ovulación, fertilización y embriones colectados (Donaldson, 1984b; Lerner *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2009). Contrario a esto, cuando animales muy jóvenes son tratados con dosis elevadas de gonadotropinas se produce una sobreestimulación ovárica y se desarrollan muchos folículos pero pocos son capaces de ovular sufriendo la mayoría atresia folicular (Lerner *et al.*, 1986; Breuel *et al.*, 1991).

Chagas *et al.* (2002) compararon la calidad del embrión de vacas y vaquillas de raza Holstein y reportaron una baja respuesta superovulatoria, baja tasa de fertilización y un menor número de embriones viables en las vacas con relación a las vaquillas, lo cual fue asociado a concentraciones bajas de progesterona durante el diestro. Estas diferencias se atribuyeron a la competencia en cuerpos lúteos y las tasas de ovulación. Al igual, Leroy *et al.* (2005) compararon la calidad del embrión en vacas lactando y vaquillas de raza Holstein y encontraron una apariencia oscura y reducida calidad en los embriones de las vacas, comparado con los embriones de las vaquillas. Ellos sugieren que esto puede ser causado por una acumulación de gotas de lípidos.

2.6.4. Factores hormonales

Existe una extensa variabilidad de productos utilizados para inducir ovulación múltiple en bovinos, en los cuales las preparaciones hormonales influyen directamente en la respuesta superovulatoria de cada donadora de embriones (Kanitz *et al.*, 2002). La relación de actividad FSH/LH existente en cada gonadotropina juega un papel

importante (Garzón *et al.*, 2007), viéndose afectado el número y calidad de los embriones por el uso de productos gonadotróficos con una alta contaminación de LH (Moor *et al.*, 1984; Donaldson *et al.*, 1986; Kanitz *et al.*, 2002). Se han observado anomalías en el desarrollo de los ovocitos, asincronía entre el crecimiento de las células de la granulosa y la maduración de los ovocitos, se observa ocurrencia de ovulaciones prematuras, así como fallas en la ovulación de folículos individuales (Kafi y McGowan, 1997).

Murphy *et al.* (1984) analizaron la variabilidad en FSH y LH de la hMG y preparaciones de eCG y encontraron que en las preparaciones donde los niveles de LH son altos, se presenta una influencia inhibitoria en la respuesta a la ovulación. En cambio Lopes da Costa *et al.* (2001) obtuvieron diferencias en relación al número de embriones viables esto se atribuyó a la inducción de superovulación con gonadotropinas conteniendo niveles bajos de LH, en ganado nativo.

2.6.5. Factores ambientales

En regiones con clima subtropical y tropical, existe una baja tasa de concepción en el ganado lechero (Wolfenson *et al.*, 1988), factores como la radiación solar, la alta temperatura, el movimiento del aire y la alta humedad relativa afectan el comportamiento de los animales con su medio ambiente (Kadzere *et al.*, 2002). Lo cual se manifiesta en la reducción de la expresión del estro y la fertilidad influidos por el estrés calórico (De Rensis y John, 2003; Jordan, 2003; Collier *et al.*, 2006).

El estrés calórico inhibe el crecimiento y la dominancia de los folículos durante el periodo preovulatorio en vaquillas y en vacas lactando, las concentraciones de E₂ se reducen, lo que provoca una extensión en la fase lútea (Wolfenson *et al.*, 1995; Wolfenson *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1998a; Wilson *et al.*, 1998b), el número de folículos pequeños se incrementa durante la mitad del ciclo estral y aumenta la concentración de P₄ en plasma (Trout *et al.*, 1998).

En los tratamientos de ovulación múltiple, la producción de embriones se ve afectada por las altas temperaturas (Hansen *et al.*, 2001; Peixoto *et al.*, 2006), la tasa de gestación disminuye y se incrementa el número de embriones anormales debido a la sensibilidad de los ovocitos y embriones al estrés calórico (Hansen, 2007).

Putney *et al.* (1988), evaluaron el efecto de humedades y temperaturas altas en el desarrollo temprano de embriones de vaquillas lecheras superovuladas, y encontraron que las humedades y temperaturas altas incrementan la incidencia de embriones con menos de 16 células, embriones anormales y células degeneradas. Ellos reportaron que cuando las donadoras son sometidas al estrés calórico antes del día 7 del desarrollo embrionario, se compromete la viabilidad del embrión incrementándose la tasa de mortalidad embrionaria.

En un estudio realizado por Lozano *et al.* (2010), evaluaron el efecto del estrés calórico en la producción embrionaria de vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras y encontraron que el estrés calórico afectó la viabilidad del embrión y el medio ambiente materno para el establecimiento de la gestación, además de que en vacas receptoras esta se redujo a un 50% cuando recibieron un embrión colectado en épocas cálidas en relación a los colectados en épocas templadas.

2.7. Justificación

Para la raza CLT, se desconoce un protocolo y la mejor dosis de hormonas para inducir ovulación múltiple, con lo cual se podrá aprovechar al máximo los animales genéticamente superiores de esta raza. Al establecer el protocolo con la mejor dosificación de FSH para este ganado y aprovechando las ventajas que ofrece la ovulación múltiple y transferencia embrionaria (OMTE), se podrá aumentar el tamaño de la población de ganado CLT en manos de los criadores, se dará un gran paso en el programa de mejoramiento genético de la raza y se contará con un banco de germoplasma con embriones disponibles para mejorar genéticamente y expandir los hatos existentes, se aumentará la cantidad de ganado puro y se dispondrá de una biotecnología reproductiva aplicada a esta raza, para ser aprovechada por los socios de la Asociación Mexicana de Criadores de Ganado Romosinuano y Lechero Tropical (AMCROLET A.C) y ganaderos interesados en esta raza. Por lo anterior, se plantearon los objetivos e hipótesis siguientes:

2.8. Objetivos

2.8.1. Objetivo general

Establecer el mejor protocolo de ovulación múltiple con base en la Hormona Folículo Estimulante (FSH) en hembras Criollo Lechero Tropical.

2.8.2. Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta superovulatoria con tres tratamientos a diferentes niveles de FSH (Folltropin-V) en un protocolo de superovulación a base de progestágenos y estradiol.
- Conocer el número y calidad de los embriones obtenidos en cada tratamiento.

2.9. Hipótesis

2.9.1. Hipótesis general

Las donadoras Criollo Lechero Tropical, al ser animales de talla mediana y altamente fértiles en condiciones tropicales, comparadas a otras razas lecheras y cárnicas, manifiestan una mejor respuesta superovulatoria a la aplicación de dosis bajas de FSH (Folltropin-V) en relación a la dosis convencional.

2.9.2. Hipótesis específicas

- La respuesta superovulatoria en cada uno de los tratamientos es diferente.
- Con la aplicación de dosis menores a la convencional se obtienen más embriones con calidad transferible y una menor sobreestimulación ovárica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del área de estudio

El estudio se realizó en dos localidades del estado de Veracruz: 1) el rancho La Capilla, localizado en el municipio de Cotaxtla, a 18° 53´ N y 96° 15´ O y a 32 msnm. La precipitación y temperatura medias anuales son de 1400 mm, distribuidas de junio a noviembre y 25 °C; y 2) en el Campus Veracruz del CP, localizado en la comunidad de Tepetates, municipio de Manlio Fabio Altamirano, a 19° 11´ N y 96° 20´ O, a 23 msnm, precipitación y temperatura medias anuales de 1060 mm y 26.4 °C. El clima de ambas localidades corresponde al AW (w)(i) g, cálido subhúmedo con lluvias en verano (García, 1988).

3.2. Animales experimentales

En el primer ensayo realizado en marzo de 2012, se utilizaron 12 vaquillas vírgenes CLT de 35.0±1.7 meses y 404.9±11.6 kg. Todas las vaquillas presentaron ciclos estrales regulares verificados por observación diaria y se realizó palpación ovárica transrectal para descartar posibles problemas en los ovarios de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS, por su siglas en inglés; Stringfellow y Seidel, 1998). La condición corporal media de las vaquillas fue 3.2±0.3 en escala de 1 (emaciado) a 5 (obeso) (Wildman *et al.*, 1982). Cinco vaquillas presentaron el cérvix estrecho que no permitió introducir el catéter Foley para la recolección de los embriones por lo que de ellas solamente se recolectó información parcial del estudio. El problema de cérvix estrecho fue encontrado en vaquillas Holstein vírgenes (Hasler *et al.*, 1983). En el segundo ensayo realizado en el mes de julio de 2012, se utilizaron 6 vaquillas vírgenes y 5 vacas de primero y segundo parto de 50.6±6.2 meses y 429.6±12.1 kg, que presentaron ciclos estrales regulares y condición corporal media de 3.1±0.8. Las hembras experimentales donadoras son genéticamente superiores en producción de leche a 305 d y pertenecen a los animales élite de la población. Para su cubrición se utilizaron pajillas descongeladas de semen de siete sementales CLT probados genéticamente superiores para la producción de

leche a 305 d. El semen fue valorado microscópicamente y presentó movilidad individual progresiva después del descongelado superior de 60%. Los sementales se asignaron aleatoriamente para cubrir a las hembras de acuerdo a la estructura de seis familias establecidas en el núcleo de selección con el fin de evitar consanguinidad en la descendencia.

3.3. Manejo de las donadoras de embriones

Las donadoras se alimentaron en potreros de pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*), grama nativa (*Paspalum spp*) y pasto pará (*Brachiaria mutica*), y se usó un suplemento con alimento concentrado con 18% de proteína cruda a razón de 2 kg d⁻¹ animal⁻¹ y ensilado de maíz a razón de 15 kg d⁻¹ animal⁻¹, además recibieron sales minerales y agua a libertad. Las donadoras se manejaron con gamarra y realizaron una caminata de 10 min d⁻¹, se cepillaron, desparasitaron internamente vía oral (Alban al 10%, Laboratorios Andoci S. A.) y externamente (Bovitraz al 12.5%, Laboratorios Bayer S. A.) por aspersión cada 20 d y recibieron dos aplicaciones de selenio (Mu Se[®], Laboratorios Schering-Plough) y fósforo orgánico (Catosal, Laboratorios Bayer Health Care) 30 y 10 d previos al inicio del protocolo de superovulación. La conducta de las donadoras se observó durante 1 h por la mañana y 1 h por la tarde y se determinó que todas presentaran ciclos estrales regulares en un intervalo de 18 a 24 d.

3.4. Protocolo de superovulación y tratamientos

Se utilizó un protocolo de superovulación a tiempo fijo (Figura 1). En el día cero a cada donadora se le insertó un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR-B[®], 1.9 g Dec Manufacturing) y se le aplicaron 2.5 mg de Benzoato de estradiol (BE, Estrol, Deffler, Instituto Agrobioquímico S.A. de C.V) y 50 mg de Progesterona (P₄, Fort Dodge Animal Health S. de R.L. de C.V) de manera intramuscular. Del día cuatro al siete por la mañana y por la tarde se aplicaron dosis diarias decrecientes de FSH (Folltropin-V, NIH-FSH-P1, Bioniche Animal Health Inc., Figura 1) que completaron niveles totales de 260 (FSH1), 210 (FSH2) y 160 (FSH3) mg, que correspondieron a los tres tratamientos, cada uno asignado al azar a cuatro donadoras en el primer ensayo y

solamente los dos niveles más altos a seis y cinco donadoras en el segundo ensayo. El día seis por la mañana y por la tarde se aplicaron dosis intramusculares de 25 mg de PGF_{2α} (Lutalyse, Dinoprost-trometamina, Laboratorios Pfizer). El CIDR se retiró a las 24 h de aplicada la PGF_{2α} y cada donadora recibió dosis intramusculares de 200 UI de eCG (Folligón, Laboratorios Intervet) por la mañana y por la tarde. El día ocho por la mañana se aplicó una dosis intramuscular de 0.25 mg de GnRH (Gonadorelina Fertagyl, Laboratorios Intervet). La primera IA se realizó a las 36 h de retirado el CIDR con dos pajillas de semen y la segunda a las 48 h con otras dos pajillas.

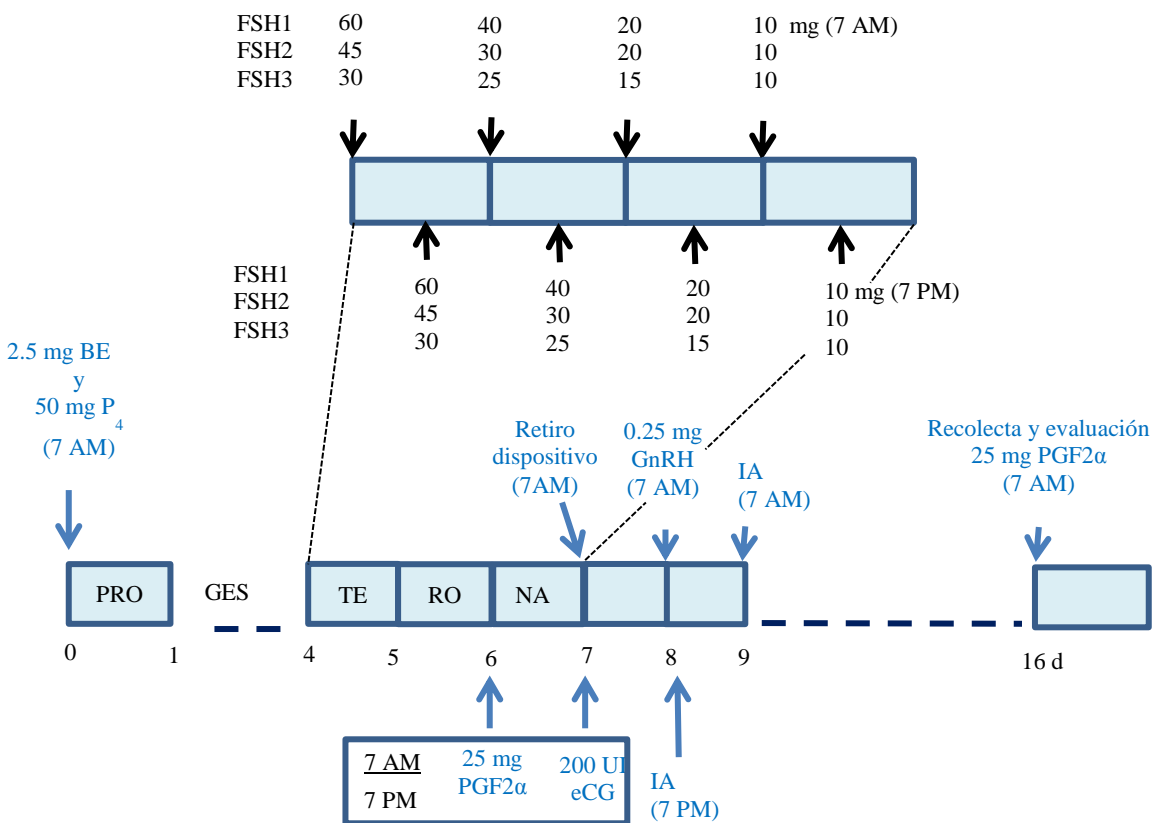


Figura 1. Protocolo de superovulación utilizado en hembras Criollo Lechero Tropical.

3.5. Recolección y clasificación de embriones

Los embriones se recolectaron por el método no quirúrgico (Seidel y Seidel, 1991) nueve días después de retirado el CIDR (Figura 1). El número de cuerpos lúteos se determinó por palpación ovárica transrectal antes de iniciar el lavado. Las áreas epidural y perineal y los labios vulvares se desinfectaron con yodo espuma, yodo

germisin y alcohol al 70 %; el área epidural se anestesió con 5 a 10 mL de lidocaína al 2% (Astra Zeneca, S.A. de C.V.). Los embriones se recolectaron con un catéter Foley de dos vías de 14 ó 20 fr con globo de 30 cc, para el lavado se utilizó 1 L animal⁻¹ de medio de recolección (Vigro Complete Flush Solution, Bioniche). Los embriones fueron recuperados en ambos cuernos con un filtro EmCon. Al finalizar la colecta se aplicaron 25 mg de PGF2 α animal⁻¹ para lisar los cuerpos lúteos existentes y evitar una posible gestación. Los embriones se localizaron utilizando un estereoscopio (ZS-6Plus, Bausch & Lomb). Los embriones se colocaron en un medio de mantenimiento (Vigro Holding Plus, Bioniche) y se clasificaron de acuerdo a las recomendaciones de la IETS (Stringfellow y Seidel, 1998).

3.6. Variables de respuesta

Las variables de respuesta se determinaron de acuerdo a las normas de la IETS (Stringfellow y Seidel, 1998), se consideró que la donadora respondió al tratamiento cuando al momento de la recolección de embriones presentó dos o más cuerpos lúteos determinados por palpación ovárica transrectal.

3.6.1. Cuerpos lúteos (CL). Número de cuerpos lúteos contados en cada ovario por medio de palpación transrectal momentos antes de iniciar la colecta de embriones.

3.6.2. Ovocitos no fertilizados (ONF). Número de óvulos recolectados sin fertilizar.

3.6.3. Embriones degenerados (ED). Número de embriones con defectos; numerosos blastómeros extruidos, células de diferentes tamaños, grandes vesículas pero masa embrionaria viable de apariencia.

3.6.4. Blastocistos (B). Se identificaron por una pronunciada diferenciación de la capa exterior y el trofoblasto más oscuro, la masa celular interna evidentemente más compacta, el blastocele es muy prominente con el embrión que ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

3.6.5. Embriones calidad 1 (EC1). Se identificaron por su forma simétrica y esférica, la masa del embrión con blastómeros individuales que son uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es compatible con su etapa de desarrollo, las irregularidades son mínimas y por lo menos 85% del material celular mantiene una masa intacta embrionaria viable, la zona pelucida es suave y no tiene superficies cóncavas o planas que puedan causar que el embrión se adhiera a una caja de Petri.

3.6.6. Embriones transferibles (ET). Número de embriones con calidad 1 y 2, entre los cuales se encuentran las mórulas, blastocisto joven, blastocisto y blastocisto expandido.

3.6.7. Total de estructuras colectadas (TEC). Número total de estructuras colectadas en sus diferentes estadios, incluyendo ovocitos no fertilizados.

3.7. Análisis estadístico

Las variables de respuesta se analizaron con un modelo lineal de efectos fijos:

$$y_{ijk} = \mu + E_i + T_j + \beta_1(x_{1ijk} - \bar{x}_{1...}) + \beta_2(x_{2ijk} - \bar{x}_{2...}) + \beta_3(x_{3ijk} - \bar{x}_{3...}) + \epsilon_{ijk}$$

donde;

y_{ijk} = observación k-ésima del j-ésimo tratamiento e i-ésimo ensayo.

μ = constante que caracteriza a la población.

E_i = efecto fijo del i-ésimo ensayo. $i = 1, 2$.

T_j = efecto fijo del j-ésimo tratamiento. $j = 1, 2, 3$.

β_1 = coeficiente de regresión que relaciona el peso vivo con la variable de respuesta.

x_{1ijk} = peso vivo asociado a la variable de respuesta.

$\bar{x}_{1...}$ = media del peso vivo.

β_2 = coeficiente de regresión que relaciona la edad con la variable de respuesta.

x_{2ijk} = edad asociada a la variable de respuesta.

$\bar{x}_{2...}$ = media de la edad.

β_3 = coeficiente de regresión que relaciona la condición corporal con la variable de respuesta.

x_{3ijk} = condición corporal asociada a la variable de respuesta.

$\bar{x}_{3...}$ = media de la condición corporal.

ϵ_{ijk} = error aleatorio. $\epsilon_{ijk} \sim IIP(\lambda)$.

En un inicio se incluyó la pajilla del semental en el modelo, pero no tuvo efecto significativo en las variables de respuesta por lo que se eliminó. Los datos fueron procesados con el procedimiento de modelos generalizados (GENMOD) del SAS (SAS Institute, 2010). Se utilizó una distribución *Poisson* de los errores con función de enlace logística.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cuerpos lúteos

El número de CL fue la única variable de respuesta que se observó en el primer ensayo. El nivel de FSH (Folltropin-V) afectó ($p \leq 0.0001$) el número de CL con medias de 12.4 ± 1.2 , 9.0 ± 1 y 2.1 ± 0.7 para FSH1, FSH2 y FSH3; además 2 hembras del FSH3 no respondieron al tratamiento y debido a su baja respuesta este tratamiento no se incluyó en el segundo ensayo. Las covariables peso ($p \leq 0.02$) y edad ($p \leq 0.01$) afectaron el número de CL con $\hat{\beta} = 3.8 \times 10^{-3} \pm 1.7 \times 10^{-3}$ y $\hat{\beta} = -0.8 \times 10^{-3} \pm 0.3 \times 10^{-3}$. Los CL obtenidos en los tratamientos FSH1 y FSH2 fueron mayores de 6.8 ± 3.1 y 4.5 ± 1.5 obtenidos en vaquillas *Bos taurus* mantenidas en condiciones tropicales, superovuladas con FSH (Superov y Ovagen; Kanuya *et al.*, 1997). Nilchuen *et al.* (2011) en vaquillas para carne de 2 a 3 años y 326 ± 17.9 kg de la raza Kamphaeng Saen (Charolais 50, Brahaman 25 y Thai 25%) de Tailandia obtuvieron 10.3 ± 0.9 y 13.0 ± 0.9 CL cuando aplicaron dosis de 200 y 250 mg de FSH (Folltropin-V). Barati *et al.* (2006) en ganado *Bos indicus* Sistani de Irán con una dosis baja de 160 mg de FSH (Folltropin-V) obtuvieron 9.6 ± 0.6 CL, esta alta respuesta es atribuible a una mayor sensibilidad del ganado *Bos indicus* a la FSH (Barros y Nogueira, 2001). En el Cuadro 1 se presentan las medias estimadas de las variables de respuesta estudiadas.

Cuadro 1. Respuesta superovulatoria a dos diferentes dosis de FSH (Folltropin-V) en donadoras Criollo Lechero Tropical (medias mínimo cuadráticas \pm error estándar).

Tratamientos	Ovocitos no fertilizados	Embriones degenerados	Blastocistos	Embriones calidad 1	Embriones transferibles	Total de estructuras colectadas
FSH1	2.0 ± 0.6	2.3 ± 0.6	3.3 ± 0.7	2.8 ± 0.8	3.2 ± 0.7	10.3 ± 1.5
FSH2	0.5 ± 0.3	2.0 ± 0.6	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.7	3.0 ± 0.8	3.5 ± 0.8
	$p \leq 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p \leq 0.0003$

Trat = tratamiento; ONF = ovocitos no fertilizados; ED = embriones degenerados; B = blastocisto; EC1 = embriones calidad 1; ET = embriones transferibles; TER = total de estructuras recolectadas; FSH1 = 260 mg de FSH; FSH2 = 210 mg de FSH.

4.2. Ovocitos no fertilizados

La covariable edad afectó ($p \leq 0.007$) los ONF con $\hat{\beta} = -2.3 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$. Se obtuvo un mayor número de ONF con el tratamiento FSH1 (Cuadro 1) debido a los niveles altos de FSH presentes en la hipófisis y en los ovarios durante la ovulación (Kanitz *et al.*, 2002). Lopes da Costa *et al.* (2001) en ganado nativo de raza Mertolenga de Portugal al aplicar 400 mg de FSH (Folltropin-V) obtuvieron 0.7 ± 0.3 ONF. Dong-Soo *et al.* (2007) en vacas nativas de Corea con dosis de 28 y 24 mg de FSH (Artrin-R10) obtuvieron 2.1 ± 0.5 y 2.2 ± 0.5 ONF.

4.3. Embriones degenerados

Los ED no fueron diferentes entre tratamientos ($p > 0.05$, Cuadro 1). Estos valores de ED fueron inferiores de 2.8 ± 0.9 , 2.7 ± 1.7 y 3.2 ± 3 obtenidos en vacas Mertolengo de Portugal, hembras Gyr y Brahaman superovuladas con 400, 200 y 240 mg de FSH (Folltropin-V; Quaresma *et al.*, 2003; Motta *et al.*, 2011; Salgado *et al.*, 2011), pero superior de 0.7 ± 0.2 en vacas lactantes Suizo Pardo de Turquía que recibieron 400 mg de FSH (Folltropin-V; Bülbül *et al.*, 2010). Dong-Soo *et al.* (2007) de vacas nativas de Corea que recibieron 28 y 24 mg de FSH (ARtrin-R10) obtuvieron 0.8 ± 0.2 y 1.0 ± 0.3 ED.

4.4. Blastocisto

No se observaron diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$) para B y se encontró un número reducido de embriones en mórula y blastocisto expandido, lo cual puede estar relacionado al grado de desarrollo de los embriones por los días transcurridos desde la IA hasta el día siete de la recolecta (Lindner y Wright, 1983). Callesen *et al.* (1995) en vacas lecheras superovuladas con FSH y eCG obtuvieron 1.4 ± 0.6 B y Bono *et al.* (1991) en vacas de carne superovuladas con Gonadotropina Menopáusica Humana (hMG) obtuvieron valores similares de 3.3 ± 0.8 .

4.5. Embriones calidad 1

No hubo efecto de tratamientos en EC1 ($p > 0.05$). En vacas Suizo Pardo que recibieron 400 mg de FSH (Folltropin-V) se obtuvieron 2.9 ± 1.3 EC1 (Bülbul *et al.*, 2010). Singh *et al.* (1996) en vaquillas Simmental con la aplicación de 9.0 mg de oFSH-17 (Ovagen) obtuvieron 4.1 ± 0.7 EC1.

4.6. Embriones transferibles

El número de ET fue similar entre tratamientos ($p > 0.05$). Sin embargo, el máximo número de ET fue siete en FSH1 y cuatro en FSH2 y el mínimo fue cero en ambos tratamientos. Se recomienda obtener un mismo número de ET utilizando una menor cantidad de FSH. ET es la variable de respuesta más importante de una ovulación múltiple ya que a mayor número de embriones transferibles se tienen más posibilidades de producir una gestación exitosa (Schiewe *et al.*, 1987). Los valores estimados de ET fueron inferiores de 4.3 ± 1.1 y 3.4 ± 1.2 obtenidos en hembras Sistani que recibieron 200 y 160 mg de FSH (Folltropin-V; Barati *et al.*, 2006), y de 4.4 ± 3.9 , 5.7 ± 3.3 y 9.8 ± 3.0 de hembras Brahaman, y Kamphaeng Saen con dosis de 240 mg de FSH (Folltropin-V; Salgado *et al.*, 2011; Nilchuen *et al.*, 2011; Nilchuen *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados de este estudio son mayores de 1.3 ± 1.2 ET obtenidos en vaquillas *Bos taurus* de genotipos lecheros no adaptados de 20 a 28 meses y de 196 a 265 kg, superovuladas con diferentes gonadotropinas en un ambiente tropical (Kanuya *et al.*, 1997). Sugano y Watanabe (1997) evaluaron el uso de diferentes dosis de FSH-R derivada de FSH-P cruda en ganado Negro Japonés y obtuvieron valores de 4.6 ± 5.2 , 4.4 ± 3.7 y 2.0 ± 4.1 ET con dosis bajas de 16, 24 y 30 mg.

4.7. Total de estructuras recolectadas

Las covariables edad, peso y CC influyeron ($p \leq 0.002$, $p \leq 0.0133$, $p \leq 0.0009$) en TER con $\hat{\beta} = -2.7 \times 10^{-3} \pm 0.8 \times 10^{-3}$, $\hat{\beta} = 9.7 \times 10^{-3} \pm 3.9 \times 10^{-3}$ y $\hat{\beta} = 1.2 \pm 0.4$. A mayor edad de la donadora, se obtiene menor número total de embriones colectados (Lerner *et al.*, 1986) debido a que las vacas con edades avanzadas presentan menos folículos ováricos pequeños reclutados en una onda folicular (Malhi *et al.*, 2005) y menos

folículos grandes después de la superestimulación de los ovarios (Malhi *et al.*, 2006). En contraste, donadoras muy jóvenes superovuladas con dosis altas de FSH presentan una sobreestimulación ovárica y como consecuencia una pobre ovulación (Breuel *et al.*, 1991). En hembras de bajo peso se presenta una alteración en la secreción pulsátil de LH que perturba el proceso del desarrollo folicular a la fase preovulatoria (Kafi y McGowan, 1997), en hembras con CC muy alta se obtiene una pobre producción de embriones (Kadokawa *et al.*, 2008). El TER fue diferente entre tratamientos ($p \leq 0.0003$) y casi tres veces mayor en FSH1. Con dosis de 200 mg de FSH (Folltropin-V) se obtuvieron 8.2 ± 1.1 , 9.2 ± 9.0 , 9.0 ± 1.2 y 14.3 ± 3.6 TER (Barati *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2011; Nilchuen *et al.*, 2011; Nilchuen *et al.*, 2012). Con una dosis mayor de 240 mg FSH (Folltropin-V) en hembras Brahaman se obtuvo un número similar de 9.1 ± 5.6 TER (Salgado *et al.*, 2011). Aké *et al.* (1995) en ganado *Bos taurus* en condiciones tropicales con la aplicación de 38 y 45 mg de FSH-P obtuvieron 7.6 ± 3.3 TER.

5. CONCLUSIONES

El tratamiento FSH3 con dosis de 160 mg de FSH (Folltropin-V) indujo una repuesta baja en el número de cuerpos lúteos por lo que fue eliminado en el segundo ensayo. Aunque el tratamiento FSH1 con dosis de 260 mg de FSH produjo un mayor número total de estructuras recolectadas, los embriones transferibles fueron similares al tratamiento FSH2 con dosis de 210 mg, por lo que esta dosis sería la más adecuada para la superovulación de hembras CLT.

6. LITERATURA CITADA

- Anderson, G. B., and R. H. Bondurant. 1982. Multiple ovulation resulting from low level administration of PMSG to cattle at different stages of the oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 5: 85-91.
- Andrabi, S. M. H., and W. M. C. Maxwell. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim. Reprod. Sci.* 99: 223-243.
- Arav, A., S. Yavin, Y. Zeron, D. Natan, I. Dekel, and H. Gacitua. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol. Cel. Endocr.* 187: 77-81.
- Aréchiga, C. F., O. Ortíz, and P. J. Hansen. 1994. Effect of prepartum injection of vitamin E and selenium on postpartum reproductive function of dairy cattle. *Theriogenology*, 41: 1251-1258.
- Arias, R. A., y T. Mader L., P. Escobar C. 2008. Factores climáticos que afectan el desempeño productivo del ganado bovino de carne y leche. *Arch. Med. Vet.* 40: 7-22.
- Aké, L. J. R., M. E. Alfaro G., y L. Holy. 1995. Respuesta superovulatoria en Ganado *Bos indicus* y *Bos Taurus* bajo condiciones tropicales, y efecto del desarrollo y calidad del embrión sobre el porcentaje de gestación. *Vet. Méx.* 26 (3): 189-193.
- Barati, F., A. Niasari-Naslaji, M. Bolourchi, F. Sarhaddi, K. Razavi, E. Naghzali, and W. W. Thatcher. 2006. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology*. 66: 1149-1155.
- Barros, C. M., and M. F. G. Nogueira. 2001. Embryo Transfer in *Bos indicus* Cattle. *Theriogenology*, 56: 1483-1496.
- Baruselli, P. S., M. F. Sá Filho, C. M. Martins, L. F. Nasser, M. F. G. Nogueira, C. M. Barros, and G. A. Bó. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65: 77-88.
- Baruselli, P. S., R. M. Ferreira, J. N. S. Sales, L. U. Gimenes, M. F. Sá Filho, C. M. Martins, C. A. Rodrigues, and G. A. Bó. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76: 1583-1593.
- Betteridge, K. J. 1981. An historical look at embryo transfer. *J. Reprod. Fert.* 62: 1-13.
- Betteridge, K. J. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim. Reprod. Sci.* 79: 203-244.
- Bellows, R., R. Staigmiller, J. Ñ. Wilson, D. Phelps, and A. Darling. 1991. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production on beef heifers. *Theriogenology*, 35 (6): 1069-1082.

- Bényei, B., A. Gáspárdy, and C. W. C. Barros. 2001. Changes in embryo production results and ovarian recrudescence during the acclimatisation to the semiarid tropics of embryo donor Holstein-Friesian cows raised in a temperate climate. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 57-68.
- Bevers, M. M., and S. J. Dieleman. 1987. Superovulation of cows with PMSG: variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 15: 37-52.
- Beever, D. E. 2006. The impact of controlled nutrition during the dry period on dairy cow health, fertility and performance. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 212-226.
- Bergfelt, D. R., G. A. Bó, R. J. Mapletoft, and G. P. Adams. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergency at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 49: 1-12.
- Bó, G. A., y R. Mapletoft J. 1999. Control del desarrollo foliular y su aplicación en programas de superovulación de donantes de embriones. *Taurus*, 1 (4): 14-27.
- Bó, G. A., C. Guerrero D., A. Tríbulo, H. Tríbulo, R. Tribulo, y R. Mapletoft J. 2011. Nuevos tratamientos hormonales para la superovulación de donantes de embriones bovinos. *Taurus*, 13(50): 4-25.
- Bó, G. A., G. P. Adams, R. A. Pierson, and R. J. Mapletoft. 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45: 897-910.
- Bó, G. A., P. Baruselli S., and P. Chesta. 2006. Dinámica foliular, momento de la ovulación e inseminación artificial a tiempo fijo en donantes de embriones. En: *Jornadas de actualización en biotecnologías de la reproducción en bovinos (IRAC)*; Córdoba Argentina. 1-12.
- Bono, G., G. Gabai, L. Silvestrelli, and A. Comin. 1991. Superovulatory and endocrinological responses of simmental cows treated either with PMSG or hMG or combination. *Theriogenology*, 35(6): 1179-1190.
- Breuel, K. F. R. D. Baker, R. L. Butcher, E. C. Townsend, E. K. Inskeep, R. A. Dailey, and S. P. Lerner. 1991. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*, 36 (2): 241-255.
- Buffet, N. C., and P. Bouchard. 2001. The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *Chronobiol. Int.* 18: 893-919.
- Bülbül, B., M. Kirbas, M. Köse, and S. Dursun. 2010. Investigation of superovulation response in Brown Swiss cows after synchronization using progesterone and oestradiol valerate. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi.* 16(3): 463-468.

- Butler, W. R. 1998. Review: Effect of Protein Nutrition on Ovarian and Uterine Physiology in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 81: 2533-2539.
- Castellanos, F., C. S. Galina, J. A. Orihuela, R. Navarro-Fierro and R. Mondragón. 1997. Estrous expression in dairy cows and heifers (*Bos taurus*) following repeated PGF2 α injection and choice of selecting a mounting partner. *App. Anim. Behav. Sci.* 51: 29-37.
- Callesen, H., T. Greve, and P. Hyttel. 1993. Estrus characterization in superovulated cattle. *Theriogenology*, 40: 1243-1250.
- Callesen, H., P. Lovendahl, A. Bak, and T. Greve. 1995. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *Journal of Animal Science.* 73: 1539-1543.
- Carmichael, R. A., and D. V. M. 1980. History of the International Embryo Transfer Society. Part I. *Theriogenology.* 13: 1, 3-6.
- Chagas, J. S., L. C. Lopes, and J. S. Robalo. 2002. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 1-8.
- Christensen, G. L. 1991. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology*, 35 (1): 141-149.
- Colazo, M. G., y R. Mapletoft J. 2007. Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Cienc. Vet.* 9(1): 20-37.
- Collier, R. J., G. E. Dahl, and M. J. VanBaale. 2006. Major Advances Associated with Environmental Effects on Dairy Cattle. *J. Dairy. Sci.* 89: 1244-1253.
- de Alba, M. J. 2011. El libro de los Bovinos Criollos de América. Ed. Ediciones Papiro Omega, S.A. de C.V. Pp. 444.
- de Rensis, F., and R. S. John. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. *Theriogenology*, 60: 1139-1151.
- Demoustier, J. M., J. E. Beckers, P. Van Der Zwalmen, J. Closset, J. Gillard, and F. R. Ectors. 1988. Determination of porcine plasma Folltropin-V levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, 30: 379-386.
- Díaz, C., L. Quintela A., A. Peña I., J. Becerra J., y P. Herradón G. 1999. Influencia del día de inicio del tratamiento en los resultados de superovulación en vacas lecheras. *Arch. Zootec.* 48: 43-50.

- Domínguez C., N. Martínez y O. Colmenares. 2004. Características reproductivas de rebaños bovinos de doble propósito en los llanos centrales. *Zoot. Trop.* 22(2): 133-145.
- Donaldson, L. E. 1984. The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. *Theriogenology*, 22(1): 97-99.
- Donaldson, L. E. 1984a. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology*. 21 (6): 1013-1018.
- Donaldson, L. E. 1984b. Effect of age of donor cows on embryo production. *Theriogenology*, 21 (6): 963-967.
- Donaldson, L. E., D. N. Ward, and S. D. Glenn. 1986. Use of porcine follicle stimulating hormone after Chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 25 (6): 747-757.
- Dong-Soo, S., C. Chang-Yong, C. Sang-Rae, C. Sun-Ho, K. Hyun-Jong, and K. Ill-Hwa. 2007. 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*. 53(6): 1299-1303.
- Driancourt, M. A. 1999. Crecimiento Folicular en los Animales Domesticos: Mecanismos y manipulación. *In: Memorias del curso internacional de Fisiología de la Reproducción en Pequeños Rumiantes*. Septiembre 8-10. Colegio de Postgraduados, Ganadería. Montecillo, Texcoco, estado de México. Pp: 78-94.
- Dieleman, S. J., and M. M. Bevers. 1987. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG-treated cows. *J. Reprod. Fert.* 81: 533-542.
- Dieleman, S. J., M. M. Bevers, P. L. A. M. Vos, and F. A. M. de Loos. 1993. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment?. *Theriogenology*, 39: 25-41.
- Erickson, G. F., and S. Shimasaki. 2001. The physiology of folliculogenesis: the role of growth factors. *Fertil. Steril.* 76: 943-949.
- Erickson, B. H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25: 800 – 805.
- Elrod, C. C., and W. R. Butler. 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J Anim Sci.* 71: 694-701.
- Frandsen, R. D. 1974. Physiology of Female Reproduction. Chapter 24. *In: Frandsen, R. D. Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Second edition. Ed. Lea & Febiger. Pp. 320-332.

- Foote, R. H., S. E. Allen, and B. Henderson. 1989. Buserelin in a superovulatory regimen for Holstein cows: II. Yield and quality of embryos in commercial herds. *Theriogenology*, 31(2): 385-392.
- Galina, C. S., A. Orihuela, and I. Rubio. 1996. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. *Anim. Rep. Sci.* 42: 465-470.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen para Adaptarlo a las Condiciones de la República Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México. 246 p.
- Garzón, N., R. Urrego, y C. Giraldo A. 2007. Algunos factores que afectan los tratamientos de superovulación en la transferencia de embriones bovinos. *Rev. Med. Vet. Zoot.* (2), 2: 68-77.
- Ginther, O. J., L. Knopf, and J. P. Kastelic. 1989. Temporal associations among ovarian events during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fert.* 87: 223-230.
- Ginther, O. J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60(61): 61-79.
- Ginther, O. J., M. C. Wiltbank, P. M. Fricke, J. R. Gibbons, and K. Kot. 1996. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biol. Reprod.* 55: 1187-1194.
- Givens, M. D., and S. D. Marley. 2008. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology*, 69: 129-136.
- González, R., J. Velarde c., S. Zambrano, y P. Esté. 1997. Producción y transplante de embriones congelados de bovinos Criollo Limonero. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 5 (Supl. 1): 370-372.
- Gordon, I. 2003. Bovine Oestrous Cycle and Associated Events. Chapter 2. *In: Gordon, I. Laboratory Production of Cattle Embryos.* 2nd edition. Ed. CAB. International. p. 42-78.
- Goulding, D., D. H. Williams, J. F. Roche, and M. P. Boland. 1991. Superovulation in heifers using either pregnant mares serum gonadotrophin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. *Theriogenology*, 36(6): 949-958.
- Goulding, D., D. H. Williams, J. F. Roche, and M. P. Boland. 1996. Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. *Theriogenology*, 45: 765-773.
- Graeme, B. M., and H. G. Banchemo. 1999. Nutrición y Reproducción en Rumiantes. *In: Memorias del I Curso Internacional de Fisiología de la Reproducción de Rumiantes.* Septiembre 8-10. Colegio de Postgraduados, Ganadería. Montecillo, Texcoco, estado de Mexico. p: 27-58.

- Hafez, E. S. E., M. R. Jainudeen, and Y. Rosnina. 2000. Hormones, Growth Factors, and Reproduction. Chapter 3. *In*: Hafez, E. S. E., Hafez, B(eds.). Reproduction in Farm Animals. 7th edition. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. p. 33-54.
- Hansen, P. J., M. Drost, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopes, Y. M. Al-Katanani, C. E. Krininger III, and C. C. Chase Jr. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 55: 91-103.
- Hansen, P. J. 2007. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, 68: 242-249.
- Hasler, J. F. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 79: 245-264.
- Hasler, J. F., G. P. Brooke, and A. D. McCauley. 1981. The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. *Theriogenology*, 15 (1): 109.
- Hasler, J. F., A. D. McCauley, E. C. Schermerhorn, and R. H. Foote. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19: 83-99.
- Heape, W., 1890. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 48: 457-458.
- Jiménez, C. 2009. Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 56: 195-214.
- Jordan, E. R. 2003. Effects of Heat Stress on Reproduction. *J. Dairy. Sci.* 86 (E. Suppl.): E104-E114.
- Kadokawa, H., N. Tameoka, M. Uchiza, Y. Kimura, and M. Yonai. 2008. Short Communication: A Field Study on the Relationship Between Body Condition and Embryo Production in Superovulated Holstein Yearling Heifers. *J. Dairy Sci.* 91: 1087-1091.
- Kadzere, C. T., M. R. Murphy, N. Silanikove, and E. Maltz. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Liv. Prod. Sci.* 77: 59-91.
- Kafi, M., and M. R. McGowan. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 137-157.
- Kamwanja, L. A., C. C. Chase Jr, J. A. Gutierrez, V. Guerriero Jr, T. A. Olson, A. C. Hammond and P. J. Hansen. 1994. Response of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. *J. Anim. Sci.* 72: 438-444.

- Kanitz, W., F. Becker, F. Schneider, E. Kanitz, C. Leiding, H. P. Nohner, and R. Pöhland. 2002. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 587-599.
- Kanuya, N., H. Callesen, P. Hyttel, R. Assey, and T. Greve. 1997. Superovulatory response of dairy cattle (*Bos taurus*) in a tropical environment. *Theriogenology*. 47: 1583-1593.
- Kinder J., M. Day, and R. Kittok. 1987. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *J. Reprod. Fertil.* 34(Suppl.):167-186.
- Krinninger III, C. E., J. Block, Y. M. Al-Katanani, R. M. Rivera, C. C. Chase Jr, and P. J. Hansen. 2003. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 13-24.
- Kulick, L. J., D. R. Bergfelt, K. Kot, and O. J. Ginther. 2001. Follicle Selection in Cattle: Follicle Deviation and Codominance Within Sequential Waves. *Biol. Reprod.* 65: 839-846.
- Lauria, A., O. Oliva, A. R. Genazzani, F. Cremonesi, S. Crotti, and M. Barbetti. 1982. Improved method to induce superovulation in cattle using Human Menopausal Gonadotrophin (HMG). *Theriogenology*, 18: 357-364.
- Lerner, S. P., W. V. Thayne, R. D. Baker, T. Henschen, S. Meredith, E. K. Inskeep, R. A. Daily, P. A. Lewis, and R. L. Butcher. 1986. Age dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63: 176-183.
- Leroy, J. L. M. R., G. Opsomer, S. De Vliegher, T. Vanholder, L. Goossens, A. Geldhof, P. E. J. Bols, A. de Kruif, and A. Van Soom. 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, 64: 2022-2036.
- Lima, W. M., A. D. Vieira, A. Thaller Neto, A. Mezzalira, R. C. Matos, and R. M. Gregory. 2007. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. *Anim. Reprod. Sci.* 100: 364-370.
- Lindner, G. M., and R. W. Wright Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20(4): 407-416.
- Lindsell, C. E. B. D. Murphy, and R. J. Mapletoft. 1986. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, 26(2): 209-219.
- Looney, C. R., B. W. Boutte, L. F. Archbald, and R. A. Godke. 1981. Comparison of once daily and twice FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology*, 15 (1): 13-22.

- Lopes da Costa, L., J. Chagas e Silva, and J. R. Silva. 2001. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*, 56: 65-77.
- Lohuis, M. M. 1995. Potential benefits of bovine Embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*, 43: 51-60.
- Lozano, D. R. R., M. A. Asprón P., C. G. Vásquez P., E. González P., y C. F. Aréchiga F. 2010. Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 1 (3): 189-203.
- Malhi, P. S., G. P. Adams, and J. Singh. 2005. Bovine model for the study of reproductive aging in women: Follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biology of Reproduction*. 73: 45-53.
- Malhi, P. S., G. P. Adams, R. A. Pierson, and J. Singh. 2006. Bovine model of reproductive aging: Response to ovarian synchronization and superstimulation. *Theriogenology*. 66: 1257-1266.
- Mapletoft, J. R. 2012. Perspectives on Bovine Embryo Transfer. *Adv. Dairy. Tech.* 24: 83-93.
- Mapletoft, J. R., and J. F. Hasler. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24 (1): 393-403.
- Mapletoft, J. R., K. S. Bennett, and G. P. Adams. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:601-611.
- Matteri, R. L., and G. P. Moberg. 1982. Effect of cortisol or adrenocorticotrophin on release of luteinizing hormone induced by luteinizing hormone releasing hormone in the dairy heifers. *J. Endocrinol.* 92: 141-146.
- McGowan, M. R., M. Braithwaite, W. Jochle, and R. J. Mapletoft. 1985. Superovulation of beef heifers with pergonal (HMG): a dose response trial. *Theriogenology*, 24(2): 173-184.
- Meza, H. C. A. 2003. Desarrollo Folicular, Luteogénesis y Esteroidogénesis. Arquitectura y Función del Cuerpo Lúteo. *In: Memorias del curso internacional de Fisiología de la Reproducción en Rumiantes.* Septiembre 23-26. Colegio de Postgraduados, Ganadería. Montecillo, Texcoco, estado de México. Pp: 189-202.
- Morrow, A. D. 1969. Estrous behavior and ovarian activity in prepuberal and postpuberal dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 52: 224-227.
- Moore, K., and W. W. Thatcher. 2006. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 1254-1266.

- Moor, R. M., Th. A. M. Kruij, and D. Green. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis. Limit to superovulation. *Theriogenology*, 21, 103-166.
- Motta, D. P. A., N. M. Ramirez Y., N. Ramos C., A. F. Valencia H., y W. Perdomo T. 2011. Respuesta superovulatoria en número y calidad embrionaria de vacas y novillas Gyr lechero en clima cálido húmedo. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 12(10):1-14. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101011.html>.
- Munro, R. K. 1986. The superovulatory response of *B. taurus* and *B. indicus* cattle following treatment with follicle stimulating hormone and progesterone. *Anim. Reprod. Sci.* 11: 91-97.
- Murphy, B. D., R. J. Mapletoft, J. Manns, and W. D. Humphrey. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21 (1): 117-125.
- Nilchuen, P., S. Rattanatabtimtong, and S. Chomchai. 2011. Superovulation with different doses of follicle stimulating hormone in Kamphaeng Saen beef cattle. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 33(6): 679-683.
- Nilchuen, P., S. Chomchai, and S. Rattanatabtimtong. 2012. Superovulation with different doses of follicle stimulating hormone in Kamphaeng Saen beef cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11(5): 676-680.
- Nogueira, M. F. G., B. J. P. Barros, A. B. Teixeira, L. A. Trinca, M. J. D'Occhio, and C. M. Barros. 2002. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*, 57: 1625-1634.
- Nolan, R., O. O'Callaghan, R. T. Duby, P. Lonergan, and M. P. Boland. 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology*, 50: 1263-1274.
- Orihuela, A. 2000. Some factors affecting the behavioral manifestation of oestrus in cattle: A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 70: 1-16.
- Oussaid, B., P. Lonergan, H. Khatir, A. Guler, D. Monniaux, J. L. Touze, J. F. Beckers, Y. Cognie, and P. Mermillod. 2000. Effect of GnRH antagonist-induced prolonged follicular phase on follicular atresia and oocyte developmental competence in vitro in superovulated heifers. *J. Reprod. Fert.* 118: 137-144.
- Papkoff, H. 1981. Variations in the properties of Equine Chorionic Gonadotropin. *Theriogenology*, 15 (1): 1-11.
- Peixoto, M. G. C. D., J. A. G. Bergmann, C. G. Fonseca, V. M. Penna, and C. S. Pereira. 2006. Effects of environmental factor on multiple ovulation of zebu donors. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58 (4): 567-574.

- Pino, T., G. Martínez E., R. Galíndez, M. Castejón, y A. Tovar. 2009. Efecto del grupo racial y algunos factores no genéticos sobre la producción de leche e intervalo entre partos en vacas de doble propósito. *Rev. Fac. Cien. Vet* 50(2): 93-104.
- Putney, D. J., M. Drost, and W. W. Thatcher. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*, 30 (2): 195-209.
- Quaresma, M. A., L. Lopes da Costa, and J. Robalo Silva. 2003. Superovulation of Mertolenga cows with two FSH preparations (FSH-P and Follitropin). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 98(546): 81-84.
- Rajamahendran, R., J. D. Ambrose, E. J-P, Schmitt, M-J. Thatcher, and W. W. Thatcher. 1998. Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, Follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 50: 1141-1155.
- Richards, J. S., D. L. Russell, S. Ochsner, M. Hsieh, K. H. Doyle, A. E. Falender, Y. K. Lo, and S. C. Sharma. 2002. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent. Prog. Horm. Res.* 57:195-220.
- Rodríguez, L., V. Valencia L., R. Zulma, J. Andrade C., J. Ochoa, M. Giraldo, M. Vélez, y J. Maldonado G. 1998. Respuesta superovulatoria de vacas criollas blanco orejinegro (BON) al tratamiento con FSH o PMSG: Informe de tres casos. *Rev. Col. Cien. Pec.* 11(1): 37-44).
- Romo, G. S. 1993. Biotecnología reproductiva: Avances en Ganado bovino. *Vet. Méx.* 24: 177 – 184.
- Rouse, J. E. 1977. *The Criollo: Spanish cattle in the Americas*. University of Oklahoma, Press, Norman, Oklahoma. 303 p.
- Salgado, O. R., A. Mejía A., y S. Suárez P. 2011. Eficiencia de la respuesta superovulatoria del ganado Brahman al protocolo P-24. *Rev. MVZ. Córdoba*. 16(2): 2521-2527.
- Saltiel, A., C. Galina, y S. B. Fernández. 1988. Endocrinología de la reproducción. Capítulo 4. *In: Galina, C., A. Saltiel, J. Valencia, J. Becerril, G. Bustamante, A. Calderón, A. Duchateau, S. Fernández, A. Olguin, R. Páramo, L. Zarco. Reproducción de animales domésticos. 1^{ra}. Reimpresión. Ed. Limusa. Pp. 49-66.*
- Santos, J. E. P., J. A. Bartolome, R. L. A. Cerri, S. O. Juchem, O. Hernandez, T. Trigg, and W. W. Thatcher. 2006. Effect of deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 61: 421-435.
- SAS Institute. 2010. SAS 9.3 for windows. SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA.

- Sato, T., K. Nakada, Y. Uchiyama, Y. Kimura, N. Fujiwara, Y. Sato, M. Umeda, and T. Furukawa. 2005. The effect of Pretreatment with Different Doses of GnRH to Synchronize Follicular Wave on superstimulation of Follicular Growth in Dairy Cattle. *J. Reprod. Dev.* 51(5): 573-578.
- Saumande, J., and D. Chupin. 1981. Production of PMSG antiserum in cattle: assay of inhibitory activity and use in superovulated heifers. *Theriogenology*, 15(1): 108.
- Saumande, J., and D. Chupin. 1986. Induction of superovulation in cyclic heifers: the inhibitory effect of large doses of PMSG. *Theriogenology*, 25 (2): 233-247.
- Saumande, J., R. Procureur, and D. Chupin. 1984. Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology*, 21 (5): 727-731.
- Schiewe, M. C., C. R. Looney, C. A. Johnson, K. G. Hill, and R. A. Godke. 1987. Transferable embryo recovery rates following different insemination schedules in superovulated beef cattle. *Theriogenology*. 28(4): 395-406.
- Schillo, K. K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70: 1271-1282.
- Schultz, R. H., and D. V. M. 1980. History of the International Embryo Transfer Society. Part II. *Theriogenology*, 13(1): 7-11.
- Segerson, E. C. Jr., F. A. Murray, A. L. Moxon, D. R. Redman, and H. R. Conrad. 1977. Selenium/vitamina E: role in fertilization of bovine ova. *J. Dairy Sci.* 60: 1001-1005.
- Segura-Correa, J. C., y R. Montes-Pérez C. 2001. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Rev. Biomed.* 12: 196-206.
- Seidel Jr, E. G., and S. M. Seidel. 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. *FAO Animal Production and Health Paper 77*. Rome Italy. Pp. 164.
- Senger. L. P. 2005. Reproductive Ciclicity- Terminology and basic concepts. Chapter 7. *In: Senger, L. P. Pathways to Pregnancy and parturition. Second Revised Edition.* Ed. Current Conceptions, Inc. p. 145-163.
- Short, R. E., and D. C. Adams. 1988. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. *Can. J. Anim. Sci.* 68: 29-39.
- Silva, J. C. C., R. H. Álvarez, C. A. Zanenga, and G. T. Pereira. 2009. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. *Anim. Reprod.* 6 (3): 440-445.
- Singh, S. P., P. J. Broadbent, J. S. M. Hutchinson, R. G. Watt, and D. F. Dolman. 1996. Follicular dynamics and superovulatory response in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 43: 183-190.

- Staigmiller, R. B., R. A. Bellows, G. B. Anderson, G. E. Seidel Jr, W. D. Foote, A. R. Menino Jr, and R. W. Wright Jr. 1992. Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. *Theriogenology*, 37: 1091-1099.
- Stringfellow, A. D., and S. M. Seidel. 1998. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3ra. Edition Savoy, IL, 7-170.
- Stroud, B., and D. V. M. Chairperson. 2010. The year 2009 worldwide statistics of embryo transfer in domestics farm animals. A report from the IETS Statistics and Data Retrieval Committee. *Embryo Transfer Newsletter*. 28: 11-21.
- Stroud, B., and J. F. Hasler. 2006. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, 65: 65-76.
- Suárez, C. D., M. Gaviria T., y C. Gómez J. 2001. La buserelina en programas de superovulación para transferencia de embriones. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 14(2): 129-135.
- Sugano, M., and S. Watanabe. 1997. Use of Highly purified porcine FSH preparation for superovulation in Japanese Black cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*. 59(3): 223-225.
- Thibier, M. 2010. Biosecurity its added value to Embryo Transfer. *Act. Sci. Vet.* 38 (Supl 2): s649-s659.
- Thibier, M., and D. A. Stringfellow. 2003. Health and Safety Advisory Committee (HASAC) of the International Embryo Transfer Society (IETS) has managed critical challenges for two decades. *Theriogenology*, 59: 1067-1078.
- Trout, P. J., L. R. McDowell, and P. J. Hansen. 1998. Characteristics of the Estrous Cycle and Antioxidant Status of Lactating Holstein Cows Exposed to Heat Stress. *J. Dairy. Sci.* 81: 1244-1250.
- Umbaugh, E. R. 1949. Superovulation and ovum transfer in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 10: 295-305.
- Velazquez, A. M. 2008. Assisted Reproductive Technologies in cattle: Applications in Livestock Production, Biomedical Research and Conservation Biology. *ARBS Annu. Rev. Biomed. Sci.* 10: 36-62.
- Voss, H. J., S. E. Allen, R. H. Foote, P. Im, C-K. Kim, and P. Aquadro. 1989. Buserelin in a superovulatory regimen for Holstein cows. I. Pituitary and ovarian hormone response in an experimental herd. *Theriogenology*, 31(2): 371-384.
- Vos, P. L. A. M., A. van der Schans, A. A. C. de Wit, M. M. Bevers, A. H. Willemse, and S. J. Dieleman. 1994. Effects of neutralization of pregnant mares serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-

- superovulated heifers on follicular function and development. *J. Reprod. Fert.* 100: 387-393.
- Wals, J. H., R. Mantovani, R. T. Duby, E. W. Overstrom, J. R. Dobrinsky, W. J. Enright, J. E. Roche, and M. P. Boland. 1993. The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology*, 40: 313-321.
- Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, J. R. Trout, and T. N. Lesch. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy. Sci.* 65(3): 495-512.
- Wildt, D. E., S. T. Monfort, A. M. Donoghue, L. A. Johnston, and J. Howard. 1992. Embryogenesis in conservative biology-or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, 37: 161-184.
- Willett, E. L., W. G. Black, L. E. Casida, W. H. Stone, and P. J. Buckner. 1951. Successful transplantation of a bovine ovum. *Science*: 113, 247.
- Wilson, S. J., R. S. Marion, J. N. Spain, D. E. Spiers, D. H. Keisler, and M. C. Lucy. 1998a. Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. *J. Dairy. Sci.* 81: 2124-2131.
- Wilson, S. J., C. J. Kirby, A. T. Koenigsfeld, D. H. Keisler, and M. C. Lucy. 1998b. Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 2. Heifers. *J. Dairy. Sci.* 81: 2132-2138.
- Wolfenson, D., B. J. Lew, W. W. Thatcher, Y. Graber, and R. Meidan. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 9-19.
- Wolfenson, D., I. Flamenbaum, and A. Berman. 1988. Hypertermia and body energy store effects on fertility and ovarian function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71: 3497-3504.
- Wolfenson, D., W. W. Thatcher, L. Badinga, J. D. Savio, R. Meidan, B. J. Lew, R. Braw-Tal, and A. Berman. 1995. Effect of Heat Stress on Follicular Development during the Estrous Cycle in Lactating Dairy Cattle. *Biol. Reprod.* 52: 1106-1113.
- Wuttke, W., K. Theiling, B. Hinney, and L. Pitzel. 1998. Regulation of steroid production and its function within the corpus luteum. *Steroids.* 63: 299-305.
- Yaakub, H., D. O'Callaghan, and M. P. Boland. 1999. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*, 51: 1259-126.

7. ANEXOS

Anexo 1. Gastos generados por donadora en el programa de superovulación de hembras Criollo Lechero Tropical.

Producto	Precio unitario (\$)	Cantidad de producto usado por donadora	Costo del producto por donadora (\$)
FSH (Folltropin-V) (frasco 20 ml/400 mg).	1,800.00	210 mg	945
PGF2 α (Lutalyse, frasco 30 ml/150 mg).	180.00	75 mg	90
Disp. Intravaginal (CIDR-B, pq/10).	1,775.00	1 dispositivo	177.5
Progesterona (frasco/10 ml/500 mg).	100.00	50 mg	10
Benzoato de estradiol (Estrol; frasco/10 ml/25 mg).	60.00	2.5 mg	.6
eCG (Folligon; caja/5 frascos/5 ml/5000 UI).	900.00	400 UI	72
GnRH (Fertagyl; frasco 50 ml/5 mg).	730.00	.25 mg	36.5
Medio de recolección "Vigro complete flush solution" (1 Lt).	345.00	1 L	345
Medio con etilenglicol (8 ml).	100.00	1.3 ml	16
Medio de mantenimiento "Vigro holding plus" (50 ml).	385.00	4.16 ml	32
Filtros para recolección de embriones EmCon.	316.38	1	316.4
Catéter Foley de 2 vías, de 20 fr., con globo de 30 cc.	66.38	1	66.4
Caja Petri cuadriculada para búsqueda 100 x 15mm, pq/10.	227.41	6 cajas	136
Caja Petri de 35 X 10 mm, pq/20.	228.44	6 cajas	137
Pajillas para embriones .25 irradiadas con rayos gamma, Paq/5.	25.86	1 Paq.	25.9
Plugs. Barritas de identificación, .25cc, 47mm, irradiadas, amarillas, Paq/50.	543.10	5 barritas	54.3
Guante francés para palpación ultrasensibles (anaranjados), Paq/100.	267.25	5 guantes	13.4
Goblets de 10mm, (5 pajillas/.5ml) Paq/200.	461.22	1 goblet	2.3
Bastones de 10 mm, (p/2 goblets) Paq/100.	353.44	1	3.5
Jeringa insulínica con embolo, de 1cc con aguja separable.	3.10	2	6.2
Jeringa de 3 ml.	3.00	5	15
Jeringa de 5 ml.	5.00	2	10
Jeringa de 10 ml.	5.00	2	10

Jeringa de 20 ml.	7.00	2	14
Jeringa de 60 ml.	8.00	2	16
Agujas No. 18 x 1 ½ .	2.00	5	10
Alban 10%, (Desparasitante oral, 250 ml).	160.00	7 ml	4.5
Bovitraz (Desparasitante externo, 1 L)	540.00	5 ml	2.7
Catosal (frasco 100 ml)	430.00	15 ml	64.5
Mu Sé (frasco 100 ml)	321.00	7 ml	22.5
Lidocaína 2% (Anestésico local)	107.00	10 ml	53.5
Alcohol (1 L)	27.30	200 ml	5.5
Yodo germisin (frasco 5 L)	260.00	200 ml	10.4
Servitoallas (Paq/2 rollos)	23.20	1 rollo	11.6
Alimento comercial 18% (bulto/40 kg)	200.00	62 kg	310
Sales minerales (saco/25 kg)	135.00	1 kg	5.6
		Total	\$3,051.8

Anexo 3. Identificación de donadoras y asignación de sementales (ENSAYO 1 y 2).

<u>ENSAYO 1</u>		<u>ENSAYO 2</u>	
ID DONADORA	ID SEMENTAL ASIGNADO	ID DONADORA	ID SEMENTAL ASIGNADO
L1	J52	L5	J3
L2	J7	L13	J57
L3	J7	L15	J7
L5	J52	L20	J3
L7	K11	L29	J52
L13	K11	L35	J3
L15	J7	K34	J7
L20	K11	J1	J3
L21	J52	J63	J52
L29	J52	J77	J3
L35	K11	F13	J57
L36	J7		

Anexo 4. Hoja de campo utilizada para resultados del lavado de embriones.

RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

FECHA: _____

Rancho: _____

Identificación de la vaca: _____ Edad: _____

Raza: _____ No. de partos: _____ C.C. _____

Cuerpos lúteos OD: _____ Cuerpos lúteos OI: _____

Hora de obtención del filtro con embriones: _____

Observaciones: _____

RESULTADOS DEL LAVADO UTERINO

Embriones obtenidos

Mórulas

Calidad 1 _____ Calidad 2 _____ Calidad 3 _____ Degeneradas _____

Total de mórulas _____

Blastocisto joven

Calidad 1 _____ Calidad 2 _____ Calidad 3 _____ Degenerados _____

Blastocisto

Calidad 1 _____ Calidad 2 _____ Calidad 3 _____ Degenerados _____

Blastocisto expandido

Calidad 1 _____ Calidad 2 _____ Calidad 3 _____ Degenerados _____

Número total de blastocistos: _____

Número de ovocitos no fertilizados: _____

Total de embriones degenerados: _____

Observaciones: _____

Anexo 5. Hembras Criollo Lechero Tropical utilizadas como donadoras de embriones.

